



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 21/08, 15/06, 5/20 // (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/17197 (43) 国際公開日 1994年8月4日 (04.08.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00089 (22) 国際出願日 1994年1月24日 (24. 01. 94) (30) 優先権データ 特願平5/10132 1993年1月25日 (25. 01. 93) JP 特願平5/19035 1993年2月5日 (05. 02. 93) JP 特願平5/286985 1993年11月16日 (16. 11. 93) JP 特願平5/334773 1993年12月28日 (28. 12. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) (JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 鈴木伸宏 (SUZUKI, Nobuhiro) (JP/JP) 〒305 茨城県つくば市大字谷田部1077番地の50 Ibaraki, (JP) 尾高麻乃 (ODAKA, Asano) (JP/JP) 〒305 茨城県つくば市吾妻3丁目11番5号 グェルンハイムK 403号 Ibaraki, (JP) 北田千恵子 (KITADA, Chieko) (JP/JP) 〒590 大阪府堺市南向陽町1丁2番8号 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 大多和明敏, 外 (OHTAWA, Akitoshi et al.) 〒105 東京都港区西新橋二丁目3番2号 ニュー栄和ビルディング Tokyo, (JP)	(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: ANTIBODY AGAINST β -AMYLOID OR DERIVATIVE THEREOF AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体およびその用途

(57) Abstract

Novel antibodies useful because of having the binding specificity for β -amyloid or derivatives thereof with β -amyloid acting as an immunogen, or monoclonal antibodies which recognize the N-terminus, C-terminus and central portion, respectively, of β -amyloid. The combination of these antibodies provides an assay method whereby β -amyloid can be specifically determined with a high sensitivity. This method is useful for diagnosing diseases in which β -amyloid or a derivative thereof participates, such as Alzheimer's disease, and the antibodies are useful for developing preventive or therapeutic agents for Alzheimer's disease.

本発明は、 β -アミロイドを免疫原として、 β -アミロイドまたはその誘導体に結合特異性を有する点で有用かつ新規な抗体、即ち β -アミロイドのN端部、C端部または中心部をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を得た。これら抗体を組み合わせることにより β -アミロイドを感度よく特異的に定量することができる測定法を提供する。この定量法は β -アミロイドまたはその誘導体が関与する疾患（例えば、アルツハイマー病など）の診断に有用であり、本発明の抗体はアルツハイマー病の予防・治療剤の開発に有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェッコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダードトバゴ
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロヴァキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム

明 細 書

 β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体およびその用途

技術分野

本発明は、 β -アミロイドまたはその誘導体に結合特異性を有する点で有用かつ新規な抗体に関する。更に詳しくは、抗原抗体反応に基づく β -アミロイドまたはその誘導体の測定法の開発、あるいは β -アミロイドまたはその誘導体が関与する疾患（例えば、アルツハイマー病など）の診断あるいはアルツハイマー病の予防・治療剤の開発に有用な抗体に関する。

背景技術

アルツハイマー病による老人性痴呆は大きな社会的問題となっており、アルツハイマー病の診断および治療方法の早期確立が望まれてきた。アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑の過剰な形成および神経原繊維変化が知られており、これらのうち老人斑の主要な構成成分の一つが β -アミロイドまたはその誘導体である。

β -アミロイドは、約40個のアミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド前駆体蛋白質（Amyloid Precursor Protein：以下、APPと称する）の細胞膜貫通領域の近傍にコードされている。 β -アミロイドのアミノ酸配列を以下に示す。

〔 β -アミロイド（1-38）〕配列番号：1

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly

[β -アミロイド (1-39)] 配列番号: 2

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val

[β -アミロイド (1-40)] 配列番号: 3

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

[β -アミロイド (1-41)] 配列番号: 4

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-
Ile

[β -アミロイド (1-42)] 配列番号: 5

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-
Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-
Ile-Ala

[β -アミロイド (1-43)] 配列番号: 6

Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-
Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-
Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-

Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-
Ile-Ala-Thr。

最近、家族性アルツハイマー病患者のなかに、A P P の点突然変異を有する家系が報告されており、 β -アミロイドがアルツハイマー病の原因物質の一つである可能性が指摘された。このような背景から、 β -アミロイドはアルツハイマー病研究の中心的な課題として極めて精力的に研究され、種々の研究成果が発表されてきた。

しかし、このように β -アミロイドに深い関心が寄せられているにもかかわらず、これまで β -アミロイドを簡便に高感度に検出する測定系に関する報告はほとんど発表されておらず、僅かに、P. Seubertらにより、 β -アミロイドのサンドイッチ酵素免疫測定法の報告がなされたに過ぎない (Nature, 359, 325-327, 1992)。このP. Seubertらの測定法の検出感度は100 pg/mlと報告されており、満足できる感度とはいえない。また、該測定法は β -アミロイドのN端28残基からなる部分ペプチド〔 β -アミロイド(1-28)と略す〕とも反応すると報告されている。しかしながら、 β -アミロイドのC端部、 β -アミロイド(29-39)、 β -アミロイド(29-40)、 β -アミロイド(29-41)、 β -アミロイド(29-42)あるいは β -アミロイド(29-43)には疎水的アミノ酸が数多く存在することから、細胞膜に埋め込まれている領域と考えられており、この部分がペプチドの凝集や沈着に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、C端部疎水的領域を有する β -アミロイドを測定することが重要であると言えるが、上記のP. Seubertらの方法は、該特異性および感度の点で、社会的要求を満足していないものである。

通常、ペプチドに対する抗体は、該ペプチドと天然あるいは合成高分子担体との複合体を免疫することにより作製されており、 β -アミロイ

ドの場合にも、親水性領域である β -アミロイドN端部、例えば β -アミロイド(1-16)を免疫原として β -アミロイド(1-40)と反応する抗体を作製し得ることは、前述したP. Seubertらの報告からも示される。しかしながら、細胞膜に埋め込まれるような疎水的領域である β -アミロイドのC端部に対する抗体を通常の方法で作製し得るかどうかは明らかではない。さらに、仮にそのような領域に対する抗体が得られたとしても、その抗体が β -アミロイドと反応するという保証は全くない。さらに、仮にその抗体が β -アミロイドに対して極めて低い親和性しか示さなかった場合、その抗体を用いて、例えば前述したP. Seubertらの報告したようなサンドイッチ酵素免疫測定法を構築し得ること期待することは一般的には困難である。即ち、これまでも、 β -アミロイドの検出を目的としてさまざまな抗体が作製されてきたにもかかわらず、 β -アミロイドC端部に対する抗体を作製し、該抗体をサンドイッチ-免疫測定法に適用することにより、 β -アミロイド(1-28)と交差反応することなしに β -アミロイドを高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発したという報告はない。また、 β -アミロイド(25-35)は、タヒキニンとアミノ酸配列上の類似性が存在し、細胞毒性を有することが報告されている(B. A. Yankner et. al. Science, 250, 279-282, 1990)。しかしながら、 β -アミロイド(25-35)に対する抗体を作製し、該抗体をサンドイッチ-免疫測定法に適用することにより、 β -アミロイド(1-28)と交差反応することなしに β -アミロイドを高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発したという報告は全くない。

さらに最近では、 β -アミロイドのなかでも、大脳実質中(老人斑)には β -アミロイド(1-42)が主に沈着し、一方脳血管には β -アミロイド(1-40)が主に沈着する(アミロイドアンギオパチー)ことが報告されている(アーチブス オブ バイオケミストリー アンド

バイオフィジックス (Arch. Biochem. Biophys.) , 301, 41-53, 1993) 。また、 β -アミロイド (1-42) 、 β -アミロイド (26-42) 、 β -アミロイド (26-43) 、 β -アミロイド (34-42) などのC端部分を含むペプチドが種となって、水溶性の β -アミロイド (1-40) などの沈着を招くことなどが示唆されている (バイオケミストリー (Biochemistry) , 32, 4693-4697, 1993) 。このような報告から、 β -アミロイド (1-40) と β -アミロイド (1-42) との沈着様式の相違がアルツハイマー病に大きく関与していると考えられる。したがって、アルツハイマー病の診断を行うには、 β -アミロイド (1-40) と β -アミロイド (1-42) とを感度良く分別定量することが重要な課題となってくる。しかしながら、このような課題を解決できる抗体は未だ報告されていない。

本発明は、C端部疎水的領域を有する β -アミロイドまたはその誘導体を感度よく特異的に定量することができる新規抗体、好ましくはモノクローナル抗体、および該抗体を用いる β -アミロイドまたはその誘導体の測定法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、 β -アミロイドまたはその誘導体の異なる部分を認識する複数のモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いる β -アミロイドの優れた測定法を開発した。そして、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体 (好ましくは、モノクローナル抗体) 、 β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に

反応するモノクローナル抗体、 β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該抗体およびハイブリドーマ細胞の製造法、該抗体を用いた競合法あるいはサンドイッチ法による β -アミロイドおよびその誘導体の免疫測定法（アルツハイマー病などの診断方法）に関する。

さらに詳しくは、本発明者らは β -アミロイド（25-35）、 β -アミロイド（35-43）、 β -アミロイド（1-40）および β -アミロイド（1-16）を免疫原として、モノクローナル抗体を複数作製し、これらを組み合わせることにより、 β -アミロイド（1-28）と交差反応することなしに β -アミロイドまたはその誘導体を高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発した。すなわち、 β -アミロイド（25-35）、 β -アミロイド（35-43）および β -アミロイド（1-40）を免疫原として β -アミロイドまたはその誘導体のC端部を認識するモノクローナル抗体、例えばBA-27a、BS-85aおよびBC-05aを確立した。それらのうち、BS-85aおよびBA-27aは、標識化した β -アミロイドを用いる競合法免疫測定法ではいずれも β -アミロイドに対して極めて低い親和性しか示さないにもかかわらず、 β -アミロイドのN端部（ β -アミロイド（1-16））に対するモノクローナル抗体のなかから特に選択された2種類の抗体、すなわちBAN-052aおよびBAN-50aと組み合わせることにより、 β -アミロイドに対して極めて高感度なサンドイッチ-免疫測定法を提供できることが明かとなった。また、BC-05aとBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ-免疫測定法は、 β -アミロイド（1-40）と交差反応することなく、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の β -アミロイドを高感度に検出することが明かとなった。さらに、本発明

者らは、 β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体、例えばBP-90aを確立した。

本発明の大きな特徴の1つは、 β -アミロイド(1-40)と β -アミロイド(1-42)とを高感度に分別定量することができるサンドイッチ定量法を提供できることである。すなわち、BA-27aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では β -アミロイド(1-40)を検出できるが β -アミロイド(1-42)は検出しない、またBC-05aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では β -アミロイド(1-42)を検出できるが β -アミロイド(1-40)は検出しない、さらにBS-85aとBAN-052aまたはBAN-50aとを組み合わせたサンドイッチ定量法では β -アミロイド(1-40)および β -アミロイド(1-42)を検出することができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ定量法によって、 β -アミロイド(1-40)と β -アミロイド(1-42)とを高感度に分別定量することができる。このような技術は、公知技術からは全く類推できない驚くべき知見である。

より具体的には、本発明は、

- (1) β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体、
- (2) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)項記載の抗体、
- (3) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)項記載の抗体、

(4) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)項記載の抗体、

(5) 抗体がモノクローナル抗体である第(1)ないし(4)項記載の抗体、

(6) 第(5)項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(7) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび(または)配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するBAN-052aで標示されるモノクローナル抗体、

(8) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび(または)配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体、

(9) 第(7)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(10) 第(8)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(11) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体、

(12) 抗体がモノクローナル抗体である第(11)項記載の抗体、

(13) 第(12)項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(14) 第(1)、第(7)、第(8)または第(11)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(15) 第(1)項記載の抗体と、第(7)または第(8)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドの定量法、

(16) 第(11)項記載の抗体と、第(1)、第(7)または第(8)項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドの定量法および

(17) アルツハイマー病の診断に用いられる第(14)～(16)項記載の定量法に関する。

上記(1)の好ましい態様は、

(18) β -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)項記載の抗体、

(19) β -アミロイドの誘導体が 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、 配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは 配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)項記載の抗体、

(20) β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドのC

端側の部分ペプチドが、 β -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである第(1)項記載の抗体、

(21) 抗体が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする第(1)、(18)ないし(20)項記載の抗体、

(22) 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)、(18)ないし(21)項記載の抗体および

(23) 抗体が配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする第(1)、(18)ないし(21)項記載の抗体である。

上記(2)の好ましい態様は、

(24) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドおよび(または)配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体および

(25) 配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドを認識することを特徴とする第(24)項記載の抗体である。

上記(3)の好ましい態様は、

(26) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有す

る β -アミロイド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドおよび（または）配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体である。

上記（4）の好ましい態様は、

（27）配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とするアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、

（28）アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドである第（27）項記載の抗体および

（29）配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドおよび配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイドを認識しないことを特徴とする第（28）項記載の抗体である。

上記（5）の好ましい態様は、

（30）BA-27aで標示される第（24）または（25）項記載のモノクローナル抗体、

（31）BS-85aで標示される第（26）項記載のモノクローナル抗体および

（32）BC-05aで標示される第（27）ないし（29）項記載のモノクローナル抗体である。

特に、

（33） β -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測

定法による定量に用いられる第（１）ないし（５）および第（１８）ないし（３２）項記載の抗体が好ましい。

上記（６）の好ましい態様は、

（３４）第（３０）項記載モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

（３５）第（３１）項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞および

（３６）第（３２）項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞である。

上記（７）および（８）の好ましい態様としては、

（３７） β -アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５または配列番号：６で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（７）または（８）項記載のモノクローナル抗体、

（３８） β -アミロイドの誘導体が 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第２番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチド、 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第３番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチドまたは 配列番号：５で表されるアミノ酸配列の第４番目～４２番目のアミノ酸配列を有するペプチドである第（７）または（８）項記載の抗体および

（３９） β -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる第（７）、（８）、（３７）または（３８）項記載の抗体である。

上記（１１）の好ましい態様としては、

（４０） β -アミロイドが配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、

配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（41） β -アミロイドの誘導体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第2番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第3番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第4番目～42番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（1.1）項記載の抗体、

（42） β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（43） β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：3で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（11）項記載の抗体、

（44）抗体が配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識することを特徴とする第（11）、（40）ないし（43）記載の抗体および

（45） β -アミロイドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる第（11）、（40）ないし（44）項記載の抗体である。

上記（12）の好ましい態様としては、

(46) B P-90 a で標示される第(12)項記載のモノクローナル抗体である。

上記(13)の好ましい態様としては、

(47) 第(46)項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞である。

上記(14)の好ましい態様としては、

(48) 第(1)、第(7)、第(8)または第(11)項記載の抗体と、被検液および標識化 β -アミロイドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化 β -アミロイドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法である。

上記(15)の好ましい態様としては、

(49) 担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が第(1)項記載の抗体であり、他方が配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体であることを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(50) 配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体がBAN-052 a またはBAN-50 a で標示されるモノクローナル抗体である第(49)項記載の定量法、

(51) 担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化

された β -アミロイドに対する抗体の一方がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第(49)項記載の定量法、

(52) 担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBA-27aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(49)項記載の定量法、

(53) 担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBS-85aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第(49)項記載の定量法および

(54) 担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはそ

の誘導体が配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（49）項記載の定量法である。

上記（16）の好ましい態様としては、

（55）担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することの特徴とし、担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が第（11）項記載の抗体であり、他方が第（1）項記載の抗体または配列番号：7もしくは配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体であることを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

（56）配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第（55）項記載の定量法、

（57）担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBA-27a、BS-85a、BC-05a、BAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体である第（55）項記載の定量法、

（58）担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配

列番号： 2 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号： 3 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号： 4 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号： 5 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および（または）配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである第（ 5 5 ）項記載の定量法および

（ 5 9 ）担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方が B P - 9 0 a で標示されるモノクローナル抗体であり、他方が B A - 2 7 a 、 B S - 8 5 a または B C - 0 5 a で標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号： 1 ～配列番号： 6 で表されるアミノ酸配列から第 1 番目～ 1 6 番目のアミノ酸配列または第 1 番目～ 1 7 番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである第（ 5 5 ）項記載の定量法である。

なお、本発明で得られた抗 β -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、 B A N - 0 5 2 、 B A - 2 7 および B S - 8 5 は平成 4 年 1 2 月 2 2 日から財団法人発酵研究所（ I F O ）に、そして平成 5 年 1 月 7 日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所（ N I B H ）に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	I F O	FERM-BP (NIBH)
B A N - 0 5 2	5 0 3 8 6	4 1 3 8
B A - 2 7	5 0 3 8 7	4 1 3 9
B S - 8 5	5 0 3 8 8	4 1 4 0

また、本発明で得られたハイブリドーマ細胞のうち、 B A N - 5 0 は平成 5 年 1 月 8 日から財団法人発酵研究所（ I F O ）に、そして平成 5 年 1 月 2 7 日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所（ N I B H ）に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	I F O	FERM-BP (NIBH)
B A N - 5 0	5 0 3 9 0	4 1 6 3

さらに、本発明で得られたハイブリドーマ細胞のうち、B C - 0 5 および B P - 9 0 は平成5年11月2日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所 (N I B H) に以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞	FERM-BP (NIBH)
B C - 0 5	4 4 5 7
B P - 9 0	4 4 5 8

なお、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に a を付けた形で表している。

本明細書において用いられる配列番号のうち、配列番号：1～配列番号：12は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

- 〔配列番号：1〕 β -アミロイド (1-38)
- 〔配列番号：2〕 β -アミロイド (1-39)
- 〔配列番号：3〕 β -アミロイド (1-40)
- 〔配列番号：4〕 β -アミロイド (1-41)
- 〔配列番号：5〕 β -アミロイド (1-42)
- 〔配列番号：6〕 β -アミロイド (1-43)
- 〔配列番号：7〕 β -アミロイド (1-28)
- 〔配列番号：8〕 β -アミロイド (25-35)
- 〔配列番号：9〕 β -アミロイド (35-43)
- 〔配列番号：10〕 β -アミロイド (1-16)
- 〔配列番号：11〕 β -アミロイド (17-28)
- 〔配列番号：12〕 β -アミロイド (18-28)

本発明における β -アミロイドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド (1-38)、配列番号：2で表さ

れるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-39)、配列番号:3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-40)、配列番号:4で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-41)、配列番号:5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)または配列番号:6で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-43)などが用いられる。

本発明における β -アミロイドの誘導体としては、上記 β -アミロイドのN端部のアミノ酸がそれぞれ1ないし17残基程度欠落したもの、L-アスパラギン酸がL-イソアスパラギン酸、D-イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸に異性化したもの、N端部にピログルタミン酸を有するものなどが用いられる。具体的には、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第2番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第3番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってN端のグルタミン酸がピログルタミン酸に変換したペプチド、配列番号:5で表されるアミノ酸配列の第4番目~42番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号:1~配列番号:6で表されるアミノ酸配列から第1番目~16番目のアミノ酸配列または第1番目~17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチド(例えば、 β -アミロイド(17-40)、 β -アミロイド(18-40)など)などが用いられる。これらの β -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物より自体公知の方法で調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。

本発明における β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、例えば β -アミロイドのN端のアミノ酸から数えて25番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドが挙げられる。

本発明における β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）としては、例えば β -アミロイドまたはその誘導体を認識するが、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（1-28）で表される β -アミロイドのN端側の部分ペプチド）を認識しない抗体などが用いられる。より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：8および配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35）および β -アミロイド（35-43））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35））を認識する抗体、より好ましくは配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35））を認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（35-43））を認識しない抗体、

(iii) 配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（35-43））を認識する抗体、より好ましくは配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（25-35））を認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（35-43））を認識する抗体などが好ましい。

上記(i)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-38）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-39）および（または）配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-40）を特に

認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-39)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-40)、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)を認識する抗体が好ましい。

また、上記(ii)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-39)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-40)および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)を特に認識する抗体が好ましい。

さらに、上記(iii)の抗体の中でも、アルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中に含まれる β -アミロイド(特に、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42))を特に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-42)を認識するが、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-38)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-39)および配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド(1-40)を認識しない抗体が好ましい。

上記(i)の抗体の代表例としては、BA-27aで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(ii)の抗体の代表例としては、BS-85aで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(iii)の抗体の代表例としては、BC-05a、BC-15a、BC-65a、BC-75a、BC-55a(特に、BC-05aが好ましい)で標示されるモノクローナル抗体がある。

ノクローナル抗体がある。

次に、本発明における β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（ β -アミロイド（1-28））および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（ β -アミロイド（1-16））を認識するモノクローナル抗体が用いられ、具体的にはBAN-50a、BAN-052a、BAN-11a、BAN-30a、BAN-20a、BAN-40aで標示されるモノクローナル抗体などがあるが、特にBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体が特に好ましい。

さらに、本発明における β -アミロイドまたはその誘導体の中心部の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）などが用いられる。これら抗体のなかでも、配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドを特に認識する抗体が好ましく、なかでも配列番号：3で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列（配列番号：11のアミノ酸配列）または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列（配列番号：12のアミノ酸配列）を有するペプチドを特に認識する抗体が好ましい。具体的には、BP-01a、BP-02a、BP-03aまたはBP-90aで標示されるモノクローナル抗体などが用いられる。これ

らモノクローナル抗体のうち、BP-03aおよびBP-90aは配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドをも認識することができる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特にBP-90aが好適である。

以下に、抗原の調製方法およびモノクローナル抗体の作成方法について詳細に説明する。

(1) 抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば β -アミロイドまたはその誘導体、 β -アミロイドまたはその誘導体を加水分解して得られる部分ペプチド、 β -アミロイドと同一の抗原決定基を1種あるいは2種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単に β -アミロイド抗原と称することもある）。

該 β -アミロイドまたはその誘導体としては、前述したものが用いられる。これら β -アミロイドまたはその誘導体は、例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、また市販の天然精製標品であってもよい。

該 β -アミロイドを加水分解して得られる部分ペプチドとしては、例えば配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有する β -アミロイド（1-43）などをアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼなどのエキソプロテアーゼによりN末端および（または）C末端から順次加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物、あるいは β -アミロイド（1-43）を種々のエンドペプチダーゼにより加水分解して得られる部分ペプチドまたはそれらの混合物などが用いられる。この方法で β -アミロイド（1-42）を作製した場合、標品中に β -アミロイ

ド（１－４１）および（または） β -アミロイド（１－４３）が混合している場合がある。

該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製した β -アミロイド抗原と同一の構造を有するものや、 β -アミロイド（１－４３）などのアミノ酸配列において３個以上、好ましくは６個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を１種あるいは２種以上含有するペプチド（以下 β -アミロイド関連合成ペプチドと略す）などが用いられる。

上記合成ペプチドは、公知の常套手段で製造することができ、固相合成法、液相合成法のいずれによっても製造することができる。具体的な、ペプチド合成の方法としては、例えばB. Merrifield [ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Am. Chem. Soc.), 85, 2149 (1963)]、M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti [ペプチド シンセーシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York, 1966年]、SchroderおよびLubke [ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York, 1965年]、泉屋信夫他 [ペプチド合成の基礎と実験、丸善、1985年]、矢島治明および榊原俊平 [生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV, 205, 1977年] などが用いられる。例えば、固相法により β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドを合成する場合には、不溶性樹脂として当該技術分野で知られたもの（例えば、クロロメチル樹脂、４-オキシメチルフェニルアセタミドメチル樹脂など）の何れかの樹脂を用い、 β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドのC末端側から保護アミノ酸を常法に従って順次縮合する。次いで、フッ化水素処理で全保護基を除去して、高速液体クロマトグラフィーなどのそれ自体公知の方法による精製後、目的とする β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドを得ることができる。

また、N-保護アミノ酸としては、 α -アミノ基はB o c基で保護し、さらに例えばセリンおよびスレオニンの水酸基はB z l基で保護し、グルタミン酸、アスパラギン酸の ω -カルボキシル基はO B z l基で保護し、リジンの ϵ -アミノ基はC l - Z基で保護し、チロシンの水酸基はB r - Z基で保護し、アルギニンのグアニド基はT o s基で保護し、ヒスチジンのイミダゾール基はB o m基で保護する方法で製造することができる。

本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

P A M	: フェニルアセタミドメチル
B o c	: t-ブチルオキシカルボニル
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
B z l	: ベンジル
O c H e x	: シクロヘキシルエステル
O B z l	: ベンジルエステル
T o s	: p-トルエンシルホニル
H O B t	: 1-ベンゾトリアゾール
M e B z l	: 4-メチルベンジル
B o m	: ベンジルオキシメチル
D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
G l y	: グリシン
A l a	: アラニン

V a l	: バリン
L e u	: ロイシン
I l e	: イソロイシン
S e r	: セリン
T h r	: スレオニン
C y s	: システイン
M e t	: メチオニン
G l u	: グルタミン酸
A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン。

β -アミロイド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該 β -アミロイド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）と β -アミロイド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた β -アミロイド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合

で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハブテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、SPDPなど）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

(2) モノクローナル抗体の作製

β -アミロイド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイント

アジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、 β -アミロイド抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、抗 β -アミロイドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗 β -アミロイド抗体価の測定は、例えば後記の標識化 β -アミロイドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃で通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗 β -アミロイド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば β -アミロイドあるいは β -アミロイド関連合成ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、

マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した β -アミロイドを加え、固相に結合した抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗 β -アミロイドモノクローナル抗体の選別、育種は通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、10~20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地 (例、RPMI 1640) で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗 β -アミロイド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗 β -アミロイドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 [例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など] に従って行われる。

また、 β -アミロイドの一部領域と反応する抗 β -アミロイド抗体を産生するハイブリドーマおよび、 β -アミロイドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗 β -アミロイドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選別はたとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして得られる 本発明の β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体、

BAN-052aで標示されるモノクローナル抗体、 BAN-50aで標示されるモノクローナル抗体および β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体は、それぞれ β -アミロイドのN端側、C端側および中心部分の部分ペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体と、被検液および標識化 β -アミロイドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化 β -アミロイドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法、

(2) 担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法であって、担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド

(1-28)）および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド(1-16)）を

認識する抗体である定量法、

(3) 担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方が β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体または配列番号：7もしくは配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体である定量法を提供する。

より具体的には、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（1-28））および（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（すなわち、 β -アミロイド（1-16））を認識する抗体がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体である。

上記の定量法（2）の中でも、特に

担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBA-27aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたは

BAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、

担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBS-85aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、あるいは

担体上に不溶化した β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された β -アミロイドまたはその誘導体に対する抗体の一方がBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドが配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法が好適である。

上記の定量法（3）の中でも、特に

担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBAN-052aまたはBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および（または）配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、あるいは

担体上に不溶化した β -アミロイドに対する抗体および標識化された β -アミロイドに対する抗体の一方がBP-90aで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がBA-27a、BS-85aまたはBC-05aで標示されるモノクローナル抗体であり、 β -アミロイドまたはその誘導体が配列番号：1～配列番号：6で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列または第1番目～17番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドである定量法が好適である。

以下に本発明の β -アミロイドまたはその誘導体（以下、 β -アミロイドと略称する）の定量法（免疫測定法）について、より詳細に説明する。

本発明の抗体は β -アミロイドを認識することができるので、 β -アミロイドの測定あるいは組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(ab')₂、Fab'あるいはFab画分などを用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、 β -アミロイド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法、サンドイッチ法などが好適に用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、上記酵素としては、安

定で比活性の大きなものが好ましく、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、例えばフルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは β -アミロイドと標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

サンドイッチ法においては、不溶化した抗 β -アミロイド抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗 β -アミロイド抗体を反応させ（2次反応）た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の β -アミロイド量を定量することができる。1次反応と2次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による β -アミロイドの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗 β -アミロイド抗体とは β -アミロイドの該抗体と結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、例えば1次反応で用いられる抗体が β -アミロイドのN端側の

部分ペプチドを認識する場合は、2次反応で用いられる抗体は、好ましくはN端側の部分ペプチド以外（すなわち、C端側の部分ペプチド）を認識する抗体が用いられる。

具体的に、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 β -アミロイド（1-40）を免疫原として作製したモノクローナル抗体のうち、 β -アミロイド（1-28）と交差反応しない抗体が好適に用いられる。本発明者らは、このような抗体を産生するハイブリドーマを2種類確立した。これらのハイブリドーマが産生する抗体は、後述する β -ガラクトシダーゼ標識化 β -アミロイド（1-40）を用いる競合法の酵素免疫測定法において、 β -アミロイド（1-28）と交差反応しなかったが、 β -アミロイド（1-40）と反応した（B/B₀ = 0.5を与える抗原濃度：200～250 nM、40～50 ng/well）。さらに、後述する β -アミロイド（1-16）を免疫原として作製した β -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体のうち、特にBAN-50aまたはBAN-052aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも β -アミロイドをより高感度に測定できることが明らかとなった（検出感度、0.2 pg/well）。すなわち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測定法に適した β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体の1種類として、 β -アミロイド（1-40）に反応し、 β -アミロイド（1-28）と交差反応しないモノクローナル抗体が好適に用いられるが、それらの抗体は必ずしも β -アミロイド（1-40）に対して高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、BA-27aなどが好都合に用いられる。

また、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる β -アミロイド

のC端側の部分ペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 β -アミロイド(25-35)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを5種類確立した。これらの抗体は、後述する β -ガラクトシダーゼ標識化 β -アミロイド(1-40)を用いる競合法の酵素免疫測定法において、 β -アミロイド(25-35)と反応し($B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 20 nM、1 ng/well)、 β -アミロイド(1-40)とも反応した($B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 800 nM、160 ng/well)。さらに、上述したBAN-50aまたはBAN-052aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも β -アミロイドをより高感度に測定できることが明らかになった(検出感度、3 pg/well)。すなわち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測定法においては、 β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体として、 β -アミロイド(25-35)に対するモノクローナル抗体が好適に用いられるが、これらの抗体は必ずしも β -アミロイド(1-40)に高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、BS-85aが好都合に用いられる。

なお、BS-85aとBAN-50aあるいはBAN-052aとを組み合わせたサンドイッチ法、あるいはBA-27aとBAN-50aあるいはBAN-052aとを組み合わせたサンドイッチ法において、 β -アミロイド(1-28)との交差反応性は認められなかった。

さらに、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、 β -アミロイド(35-43)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを18種作製した。なかでも4種類の抗体は、後述するパーオキシダ

ーゼ標識化 β -アミロイド(35-43)を用いる競合法の酵素免疫測定法において、森らの方法(ジャーナルオブバイオリジカルケミストリー、267巻、17082-17086ページ、1988年)によりアルツハイマー病患者脳から抽出した β -アミロイド画分(ギ酸抽出物)に対して高い反応性を示す一方、合成ペプチドである β -アミロイド(1-40)とは反応性を示さなかった。これらの抗体をBAN-50aと組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、上述したアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の β -アミロイドを高感度に検出し、 β -アミロイド(1-40)については全く検出しないことが明かとなった。なお、用いたアルツハイマー病患者の脳ギ酸抽出物中の β -アミロイドは、質量分析から β -アミロイド(1-42)が主要な構成成分であることがわかっており、さらにN端部にピログルタミン酸を有する β -アミロイド(3-42)や、 β -アミロイド(2-42)、 β -アミロイド(4-42)をはじめとするN端部が順次欠落した分子種を含むことが明らかにされた。

一方、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる β -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、 β -アミロイド(1-16)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを8種類作製した。これらの抗体の β -アミロイド(1-40)に対する反応性を後述するパーオキシダーゼ標識化 β -アミロイド(1-16)を用いる競合法により調べたところ、4種類の抗体が β -アミロイド(1-40)に良好な反応性を有していた($B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 25~70 nM、5~15 ng/well)。さらに、これらの抗体をサンドイッチ法に適用した場合、これら抗体の間で予想外にも大きな感度の差が認められた。すなわち、モノクローナル抗体BAN-052aが他の

3種類（BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a）の抗体と比較して群を抜いて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。そこで、サンドイッチ法にさらに適した抗 β -アミロイド（1-16）モノクローナル抗体を選択すべく新たに16種類の抗体を作製した。パーオキシダーゼ標識化 β -アミロイド（1-16）を用いる競合法により調べたところ、これらの抗体のうち10種類の抗体が β -アミロイド（1-40）に良好な反応性を有していたが、そのなかでも特にBAN-50aが極めて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。すなわち、本発明において、サンドイッチ法に適した β -アミロイドのN端側の部分ペプチドを認識する抗体として、 β -アミロイド（1-16）に対する抗体を数種類提供するが、特にBAN-50aおよびBAN-052aが好適に用いられる。

さらに、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる β -アミロイドの中心部分の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、配列番号：12で表される β -アミロイド（18-28）を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを9種類作製した。なかでも、BP-01、BP-02、BP-03、BP-90の4つのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体BP-01a、BP-02a、BP-03a、BP-90aが好適であり、BP-03aおよびBP-90aは配列番号：11で表される β -アミロイド（17-28）をも認識することができる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特にBP-90aが好適である。

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどにも用いることもができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対

して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B／F分離）、BおよびFいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B／F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法や、第1抗体として固相化抗体を用いるかあるいは第1抗体は可溶性のものを用い、第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法などが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてβ-アミロイドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編

「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法により β -アミロイドの測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

以上のように、本発明の抗体は、 β -アミロイドまたはその誘導体を感度良く定量することができるので、アルツハイマー病の診断剤等として有用である。

図面の簡単な説明

第1図は、 β -アミロイド(1-40)を免疫したマウスの抗体価を β -Gal標識化 β -アミロイド(1-40)を用いて調べた結果を示す。

第2図は、 β -アミロイド(25-35)を免疫したマウスの抗体価を β -Gal標識化 β -アミロイド(1-40)を用いて調べた結果を示す。

第3図は、 β -アミロイド(1-16)を免疫したマウスの抗体価をHRP標識化 β -アミロイド(1-16)を用いて調べた結果を示す。

第4図は、 β -アミロイド(35-43)を免疫したマウスの抗体価をHRP標識化 β -アミロイド(35-43)を用いて調べた結果を示す。

す。

第5図は、細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングの典型例を示す。(a)は β -アミロイド(1-40)を免疫したマウスを用いた場合、(b)は β -アミロイド(25-35)を免疫したマウスを用いた場合、(c)は β -アミロイド(1-16)を免疫したマウスを用いた場合、および(d)は β -アミロイド(35-43)を免疫したマウスを用いた場合である。

第6図は、 β -アミロイド(1-40)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BA-27aの β -アミロイド(1-40) (—●—)、 β -アミロイド(1-28) (—△—)、 β -アミロイド(1-16) (—○—)、 β -アミロイド(25-35) (—□—)、および β -アミロイド(35-43) (—▲—)に対する反応性を β -Gal標識化 β -アミロイド(1-40)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

同様に、第6図(b)は β -アミロイド(25-35)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BS-85aの反応性を β -Gal標識化 β -アミロイド(1-40)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

第7図(a)および(b)は、それぞれ β -アミロイド(1-16)を免疫原として作製したモノクローナル抗体BAN-052aおよびBAN-50aの β -アミロイド(1-40) (—□—)、 β -アミロイド(1-28) (—△—)、および β -アミロイド(1-16) (—○—)に対する反応性をHRP標識化 β -アミロイド(1-16)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

第8図は、BAN-052a (—●—)、BAN-11a (—○—)、BAN-20a (—△—)、BAN-30a (—□—)およびBAN-50a (—■—)の β -アミロイド(1-40)に対する反応性をHR

P 標識化 β -アミロイド (1-16) を用いる競合法-EIA で調べた結果を示す。

第9図は酵素標識抗体としてBS-85a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●—)、BAN-11a (—▼—)、BAN-20a (—▲—) またはBAN-30a (—■—) を用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第10図は、酵素標識抗体としてBA-27a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●—)、BAN-11a (—▼—)、BAN-20a (—▲—) またはBAN-30a (—■—) を用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第11図は、酵素標識抗体としてBAN-052a-HRPを用い、固相用抗体としてBA-27a (—●—) またはBS-85a (—○—) を用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第12図は、酵素標識抗体としてBAN-052a-HRP (—○—) あるいはBA-27a-HRP (—□—) を用い、固相用抗体としてBAN-052aを用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-40) の標準曲線を示す。

第13図は、酵素標識抗体としてBS-85a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●, ○—) あるいはBAN-50a (—▲, △—) を用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-40) (—●, ▲—) あるいは β -アミロイド (1-28) (—○, △—) の標準曲線を示す。

第14図は、酵素標識抗体としてBA-27a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-052a (—●, ○—) あるいはBAN-50a (—▲, △—) を用いたサンドイッチ-EIAの β -アミロイド (1-4

0) (—●, ▲—) あるいは β -アミロイド(1-28) (—○、△—) の標準曲線を示す。

第15図は、酵素標識抗体として(a) BS-85a-HRP (b) BA-27a-HRP、あるいは(c) BC-05a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-50aを用いたサンドイッチ法-EIAの、 β -アミロイド(1-38) (—○—)、 β -アミロイド(1-39) (—△—)、 β -アミロイド(1-40) (—■—)、 β -アミロイド(1-42) (—●—)、あるいは β -アミロイド(1-28) (—□—) の標準曲線を示す。

第16図は、アルツハイマー病患者脳脊髄液中の β -アミロイドの逆相-HPLCによる溶出面分の免疫活性を、酵素標識抗体として(a) BS-85a-HRP、(b) BA-27a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-50aを用いるサンドイッチ-EIAによって調べた結果を示す。

第17図は、アルツハイマー病患者由来 β -アミロイド画分(ギ酸抽出物)をゲル濾過により部分精製したのち、逆相HPLCにより分画した結果を示す(検出波長=210nm)。

第18図は、アルツハイマー病患者脳由来 β -アミロイド画分(蟻酸抽出物)の図17の逆相-HPLCの溶出面分の(a) No.35、(b) No.41および(c) No.43の質量分析スペクトルを示す。

第19図は、アルツハイマー病患者脳由来 β -アミロイド画分(蟻酸抽出物)の図17の逆相-HPLC溶出面分について、酵素標識抗体として、(a) BS-85a-HRP、(b) BA-27a-HRPおよび(c) BC-05a-HRPを用い、固相用抗体としてBAN-50aを用いたサンドイッチ-EIAによって定量した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例

〔実施例 1〕 抗原の作成

(1) β -アミロイド (1-40) の製造

市販のBoc-Val-OCH₂-PAM樹脂(アプライド バイオシステムズ社製) 0.71 g (0.5ミリモル) を用い、ペプチド合成機(アプライド バイオシステムズ社製モデル430A)を使用し合成した。樹脂上のBoc基を50%トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各2ミリモルのBoc-Gly, Boc-Val, Boc-Met, Boc-Leu, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Asn, Boc-Asp(OcHex), Boc-Glu(OcHex), Boc-Phe, Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Ser(Bzl), Boc-Arg(Tos) を β -アミロイド (1-40) のアミノ酸配列通りにHOBt/DCCで活性化して縮合し、保護 β -アミロイド (1-40)-OCH₂-PAM樹脂 2.70 gを得た。この保護 β -アミロイド (1-40)-OCH₂-PAM樹脂 0.56 gをp-クレゾール共存下無水弗化水素 10 mlで0℃、60分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 mlで2回洗浄した。これを50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、2~3 mlに減圧濃縮し、50%-酢酸水で充填したセファデックスG-25のカラム(2.0×85cm)に付し、同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し黄白色の粉末約 150 mgを得た。これを20%-アセトニトリル水(0.1%トリフルオロ酢酸含有) 50 mlに溶解し、同溶媒で充填したLiChroprep RP-18カラム(4.1×10cm)に付し、20%~70%までのアセトニトリル水溶液(0.1%トリフルオロ酢酸含有)の直線型濃度勾配溶出した。主要画分を集め再度LiChroprep RP-18カラム(2.6×6cm)に付し、0%~50%までのアセトニトリル水溶液

(0.1%トリフルオロ酢酸含有)の直線型濃度勾配溶出、主要画分を集め凍結乾燥し白色粉末10mgを得た。

アミノ酸分析値:

Gly 6.85(6), Ala 3.44(3), Val 5.68(6), Leu 2.00(2), Ile 1.39(2),
Met 0.89(1), Phe 3.21(3), Ser 1.89(2), Asp 4.35(4), Glu 4.52(4),
Lys 2.05(2), His 2.86(3), Arg 1.10(1), Tyr 0.97(1)

質量分析による(M+H)⁺ 4328.05

HPLC溶出時間 22.8分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100mm)

溶離液: A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水溶液)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用いA液からB液へ直線型濃度勾配溶質 (50分)

流速: 1.0 ml/分。

(2) [Cys¹⁷] β-アミロイド (1-16) の製造

市販のBoc-Cys(MeBzl)-OCH₂-PAM樹脂(アプライド バイオシステムズ社製) 0.75g (0.5ミリモル)を用い、ペプチド合成機(アプライド バイオシステムズ社製モデル430A)を使用し合成した。樹脂上のBoc基を50%トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各2ミリモルのBoc-Lys(Cl-Z), Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Val, Boc-Glu(OcHex), Boc-Tyr(Br-Z), Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Asp(OcHex), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe を[Cys¹⁷] β-アミロイド (1-16) のアミノ酸配列通りにHOBt/DCCで活性化して縮合し、保護 [Cys¹⁷] β-アミロイド (1-16) (MeBzl)-OCH₂-PAM樹脂 1.90gを得た。この保護 [Cys¹⁷] β-アミロイド (1-16) (MeBzl)-OCH₂-PAM樹脂 0.68gをp-クレゾール共存下無

水弗化水素 10 ml で 0℃、60 分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 ml で 2 回洗浄した。これを 50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し 50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、1~2 ml に減圧濃縮し、50%-酢酸水で充填したセファデックス G-25 (2.0×85cm) のカラムに付し、同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し、白色の粉末 136.7 mg を得た。

アミノ酸分析値:

Asp 2.17(2), Ser 0.96(1), Glu 3.04(3), Gly 1.00(1), Ala 1.00(1),
Cys 0.82(1), Val 0.99(1), Tyr 0.94(1), Phe 1.09(1), Lys 1.05(1),
His 2.89(3), Arg 0.97(1)

質量分析による (M+H)⁺ 2056.83

HPLC 溶出時間 14.8 分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100mm)

溶離液: A 液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水溶液)

B 液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用い A 液から B 液へ直線型濃度勾配溶質 (50 分)

流速: 1.0 ml/分。

(3) β-アミロイド (25-35) の製造

市販の Boc-Met-OCH₂-PAM 樹脂 (アプライド バイオシステムズ社製) 0.66 g (0.5 ミリモル) を用い、ペプチド合成機 (アプライド バイオシステムズ社製モデル 430A) を使用し合成した。樹脂上の Boc 基を 50% トリフルオロ酢酸/塩化メチレンで処理しアミノ基を遊離させた後、このアミノ基に各 2 ミリモルの Boc-Leu, Boc-Gly, Boc-Ile, Boc-Ala, Boc-Lys (Cl-Z), Boc-Asn, Boc-Ser (Bzl) を β-アミロイド (25-35) のアミノ酸配列通りに HOBt/DCC で活性化し縮合し、保護 β-アミロイド

(25-35)-OCH₂-PAM樹脂 1.14 gを得た。この保護β-アミロイド (25-35)-OCH₂-PAM樹脂 0.61 gをp-クレゾール共存下無水弗化水素 10 mlで0℃、60分間処理した後、弗化水素を減圧留去し残渣をエーテル 10 mlで2回洗浄した。これを50%-酢酸水で抽出し、不溶物を濾去し50%-酢酸水で洗浄した。濾液、洗浄液を合わせ、2~3 mlに減圧濃縮し0.1%トリフルオロ酢酸水 50 mlで希釈した後、0.1%トリフルオロ酢酸水で充填したLiChroprep RP-18カラム (2.6×10cm) に付し、0%~50%までのアセトニトリル水溶液 (0.1%トリフルオロ酢酸含有) の直線型濃度勾配溶出した。主要画分を集め凍結乾燥し白色の粉末 100 mgを得た。これをN-酢酸 0.5 mlに溶解し、同溶媒で充填したセファデックス LH-20 (1.0×96cm) に付し同溶媒で展開した。主要画分を集め凍結乾燥し白色粉末 91 mgを得た。

アミノ酸分析値:

Asp 0.97(1), Ser 0.95(1), Gly 2.94(3), Ala 1.00(1), Met 0.89(1),
Ile 1.59(2), Leu 1.00(1). Lys 0.97(1)

質量分析による(M+H)⁺ 2056.83

HPLC溶出時間 18.9 分

カラム条件

カラム: Wakosil-5C18 HG (4.6×100mm)

溶離液: A液 (0.1%-トリフルオロ酢酸水溶液)

B液 (0.1%-トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル)

を用いA液からB液へ直線型濃度勾配溶質 (50分)

流速: 1.0 ml/分。

(4) [Cys³⁴] β-アミロイド (35-43) の製造

Fmoc-Thr(tBu)-ワン樹脂 (0.46 g = 0.25ミリモル、渡辺化学

社製)を出発原料として、アプライド・バイオシステムズ社のFmoc-アミノ酸誘導体カートリッジ(1.0ミリモル)を用い、20%ピペリジン-DMF溶液によるFmoc基の脱保護後、DCC-HOBt法にて順次C末端側からペプチド鎖を延長する。このようにして、次式で表される保護ペプチド樹脂0.73gを得る。

Fmoc-Cys(Trt)-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr(tBu)-ワン樹脂

このペプチド樹脂のうち0.58g(0.20ミリモル)を氷冷下フェノール0.75g、ブタンジチオール0.25ml、チオアニソール0.5ml、脱イオン水0.5ml、トリフルオロ酢酸10mlを加え、室温で1.5時間攪拌した。樹脂を濾去し、濾液を濃縮し、残渣に氷冷下エーテルを加えて、沈澱として濾取し、十分にエーテルで洗浄した後、乾燥し白色粉末を得た。

収量 168mg(89%)

質量分析による(M+H)⁺=949.5(理論値=949.5)。

(5) β -アミロイド(1-38)および β -アミロイド(1-39)の作製

β -アミロイド(1-40)をカルボキシペプチダーゼYで限定分解することにより β -アミロイド(1-38)および β -アミロイド(1-39)を作製した。すなわち、 β -アミロイド(1-40)(Bachem社製)50 μ gとカルボキシペプチダーゼY(オリエンタル酵母社製)0.5 μ gを0.5%酢酸アンモニウム水溶液に溶解して60 μ lとし、10℃で2時間反応させた。反応後、Vydac C4(The Sep/a/rations Group社製)を用いる逆相-HPLCにより分画し、UV(210nm)で検出された3本の主なピークを質量分析により同定した。

カラム条件

カラム：Vydac C4

(The Sep/a/rations Group社製、 4.6×250 mm)

溶離液：A液 (0.1% トリフルオロ酢酸含有 5% アセトニトリル)

B液 (0.1% トリフルオロ酢酸含有 80% アセトニトリル)

溶出方法：溶離液Bの濃度を最初の5分間は30%に維持、次に60分間かけて30-50%に直線的に上昇させた。

流速：0.5 ml/分

質量分析による(M+H)⁺=4132.9： β -アミロイド(1-38)

(理論値 4132.6)

4231.6： β -アミロイド(1-39)

(理論値 4231.8)

4330.9： β -アミロイド(1-40)

(理論値 4330.9)。

〔実施例2〕免疫原の作製

(1) β -アミロイド(1-40)を含む免疫原の作製

上記実施例1(1)で得られた β -アミロイド(1-40)と牛チログロブリン(BTG)との複合体を作製し免疫原とした。すなわち、 β -アミロイド(1-40) 0.6mgを15%のDMFを含む3mMリン酸緩衝液、pH6.5、1.1mlに溶解させたのち、0.5mlの水に溶解させたBTG 2.5mgを加え、さらに終濃度0.3%のグルタルアルデヒドを加えて室温で3時間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で2日間透析した。

(2) β -アミロイド(25-35)を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (3) で得られた β -アミロイド (25-35) と BTG との複合体を作製し免疫原とした。すなわち、 β -アミロイド (25-35) 0.5 mg と BTG 2.5 mg とを、pH 4.5 に調節した水 1 ml に溶解させ、終濃度 0.4 % のグルタルアルデヒドを加えて室温で 3 時間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(3) β -アミロイド (1-16) を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (2) で得られた [Cys¹⁷] β -アミロイド (1-16) と BTG との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BTG 20 mg を、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.9) 1.4 ml に溶解させ、N-(γ -マレイミドブチリロキシ) サクシニミド (GMBS) 2.2 mg (8 μ mol) を含む DMF 溶液 100 μ l と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BTG 15 mg と [Cys¹⁷] β -アミロイド (1-16) 3.6 mg とを混合し、4℃で 2 日間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(4) β -アミロイド (35-43) を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (4) で得られた [Cys³⁴] β -アミロイド (35-43) と牛血清アルブミン (BSA) との複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BSA 21 mg (0.31 μ mol) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 1.4 ml に溶解させ、GMBS 3.5 mg (12.5 μ mol) を含む DMF 溶液 100 μ l と混合し、室温で 35 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BSA 4.5 mg と [Cys³⁴] β -アミロイド (35-43) 2.1 mg とを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(5) β -アミロイド (18-28) を含む免疫原の作製

[Cys²⁹] β -アミロイド (18-28) とBTGとの複合体を作製し、免疫原とした。すなわち、BTG 21 mgを0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.9) 1.5 mlに溶解させ、GMBS 2.4 mg (8.4 μ mol) を含むDMF溶液100 μ lと混合し、室温で40分反応させた。反応後、セファデックスG-25カラムで分画したのち、マレイミド基の導入されたBTG約7 mgと[Cys²⁹] β -アミロイド (18-28) (アコード社製) 2.0 mgとを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し4℃で3日間透析した。

〔実施例3〕 免疫

6～8週令のBALB/C雌マウスに上記実施例2記載の免疫原 β -アミロイド (1-40) -BTG複合体、 β -アミロイド (25-35) -BTG複合体、 β -アミロイド (1-16) -BTG複合体、 β -アミロイド (35-43) -BSA複合体あるいは β -アミロイド (18-28) -BTG複合体を、それぞれ約80 μ g/匹を完全フロイントアジュバントとともに皮下免疫した。以後3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに2～3回追加免疫した。

〔実施例4〕 酵素標識化抗原の作製

(1) β -D-ガラクトシダーゼ (β -Gal) 標識化 β -アミロイド (1-40) の作製

β -アミロイド (1-40) 70 μ g (16 nmol)を40 μ lのDMSOに溶解させ、トリエチルアミン160 nmol (10 μ l DMSO溶液) とN-スクシニミジル-3-(2-ピリミジルジチオ) プロピオネート (SPDP) 23 nmol (7 μ l DMSO溶液) とを加えた後、室温で90分反応させた。反応液の全量を β -Gal (酵素免疫測定法用、ベーリンガー・マンハイム社製) 1.7 mg (3.3 nmol)

の溶液 (0.1 Mリン酸緩衝液、pH 7.5、0.45 mlに溶解)に加え、4℃で1日反応させた。反応後、ウルトロゲルAcA34カラム (LKB-ファルマシア社製) で分画し、 β -Gal標識化 β -アミロイド (1-40) を得た。

(2) 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識化 β -アミロイド (1-16) の作製

上記実施例1 (2) で得られた[Cys¹⁷] β -アミロイド (1-16) と HRP (酵素免疫測定法用、ベーリンガーマンハイム社製) とを架橋し、酵素免疫測定法 (EIA) の標識体とした。すなわち、HRP 5 mg (125 nmol) を0.95 mlの0.1 Mリン酸緩衝液、pH 6.8に溶解させ、GMBS 3.6 mg (1.3 μ mol) を含むDMF溶液50 μ lと混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックス G-25カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入されたHRP 3.3 mg (78 nmol) と実施例1 (2) で作製された[Cys¹⁷] β -アミロイド (1-16) 0.56 mg (270 nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP標識化 β -アミロイド (1-16) を得た。

(3) HRP標識化 β -アミロイド (35-43) の作製

上記実施例1 (4) で得られた[Cys³⁴] β -アミロイド (35-43) とHRPとを架橋し、EIAの標識体とした。すなわち、HRP 12 mg (310 nmol) を1.4 mlの0.1 Mリン酸緩衝液、pH 6.8に溶解させ、GMBS 1.3 mg (4.5 μ mol) を含むDMF溶液100 μ lと混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックス G-25カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入されたHRP 3.2 mg (76 nmol) と実施例1 (4) で作

製された[Cys³⁴]β-アミロイド(35-43) 2.1mg (7.2μmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA 44カラムで分画し、HRP標識化β-アミロイド(35-43)を得た。

(4) HRP標識化β-アミロイド(18-28)の作製

[Cys²⁹]β-アミロイド(18-28)とHRPとを架橋し、EIAの標識体とした。すなわち、HRP 16mg (390nmol) を1.4mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)に溶解させ、GMB S 1.1mg (3.9μmol)を含むDMF溶液100μlと混合し室温で40分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムで分画した。このようにして作製したマレイミド基の導入されたHRP 6.0mg (150nmol)と[Cys²⁹]β-アミロイド(18-28) 2.5mg (1.9μmol)とを混合し、4℃で2日間反応させた。反応後ウルトロゲルAcA 44カラムで分画し、HRP標識化β-アミロイド(18-28)を得た。

〔実施例5〕抗体価の測定

(1) β-アミロイド(1-40)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

β-アミロイド(1-40)を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体(IgG画分、カッペル社製)を100μg/ml含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。次に、プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.4)で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため25%ブロッケーヌ(雪印乳業社製)を含むPBSを300μlずつ分注し、4℃で少なくとも24時間処理した。

上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーA [0.1%BSA、0.1M NaCl、1mM MgCl₂、0.05%CHAPS [3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸] および0.1%NaN₃を含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0] 50 μ l、バッファーAで希釈したマウス抗 β -アミロイド (25-35) 抗血清100 μ lを加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4 (1) で作製した β -Gal標識化 β -アミロイド (1-40)

(バッファーAで200倍希釈) 100 μ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性を4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシド (4-MUG) を用いて測定するため、20 μ g/mlの4-MUGのバッファーA (ただしCHAPSを含まない) 溶液100 μ lを加え37℃で3時間反応させた。反応を0.2M Na₂CO₃ 100 μ l加えることにより停止させたのち、遊離した4-メチルウンベリフェロンを蛍光プレートリーダー (フルオロスキャンII、ラボシステム社製) を用い、励起波長355nm、測定波長460nmで測定した。結果を〔第1図〕に示す。免疫した8匹のマウスのうち4匹に比較的高い抗体価が認められた。

(2) β -アミロイド (25-35) を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

β -アミロイド (25-35) を免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーA 50 μ l、バッファーAで希釈したマウス抗 β -アミロイド (25-35) 抗血清50 μ l、および上記実施例4 (1) で作製した β -Gal標識化 β -アミロイド (1-40) (バッファーAで100倍希釈) 50 μ lを加え4℃で16時間反

応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性を4-MUGを用いて同様に測定した。結果を〔第2図〕に示す。免疫した8匹のマウスのうち5匹に比較的高い抗体価が認められた。

(3) β -アミロイド(1-16)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

マウス抗血清中の抗体価を以下の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファーC[1%BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0]50 μ l、バッファーCで希釈したマウス抗 β -アミロイド(1-16)抗血清50 μ l、および上記実施例4(2)で作製したHRP標識化 β -アミロイド(1-16)(バッファーCで2000倍希釈)を加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム(KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い)100 μ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100 μ lを加え停止させたのち、450nmの吸収をプレートリーダー(MTP-32、コロナ社製)で測定した。結果を〔第3図〕に示す。免疫した7匹のマウス全てに β -アミロイド(1-16)に対する抗体価の上昇が認められた。

(4) β -アミロイド(35-43)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

上記実施例5(3)記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、マウス抗 β -アミロイド(35-43)抗血清、および上記実施例4(3)で作製したHRP標識化 β -アミロイド(35-43)を反応させることにより、マウス抗血清中の抗体価を測定した。結果を〔第4図〕に示す。免疫したマウス9匹のうち3匹に

比較的高い抗体価が認められた。

(5) β -アミロイド(18-28)を免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

上記実施例5(3)記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、マウス抗 β -アミロイド(18-28)抗血清、および上記実施例4(4)で作製したHRP標識化 β -アミロイド(18-28)を反応させることにより、マウス抗血清中の抗体価を測定した。免疫した7匹のマウスのうち4匹に比較的高い抗体価が認められた。

〔実施例6〕モノクローナル抗 β -アミロイド抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウスに対して200~300 μ gの免疫原を生理食塩水0.25~0.3mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫3~4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメディアウム(MEM)に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63.Ag8.U1(P3U1)を用いた〔カレントトピックス イン マイクロバイオロジー アンド イムノロジー、81、1(1978)〕。細胞融合は、原法〔ネイチャー、256、495(1975)〕に準じて行なった。すなわち、脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ血清を含有しないMEMで3度洗浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を5:1になるよう混合して、800回転で15分間遠心を行なって細胞を沈澱させた。上清を充分に除去した後、沈澱を軽くほぐし、45%ポリエチレングリコール(PEG)6000(コッホライト社製)を0.3ml加え、37℃温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加し、合計15mlのMEMを加えた後600

回転15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメデイウム（和光純薬）（GIT-10% FCS）にP3U1が1ml当り 2×10^5 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ（リンプロ社製）に1ウェル1mlずつ120ウェルに播種した。播種後、細胞を37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後HAT（ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-3} M）を含んだGIT-10% FCS培地（HAT培地）を1ウェル当り1mlずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧液を1ml捨てたあと、1mlのHAT培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約 1×10^6 セル/ml）、上清を採取し、実施例5に記載の方法に従って抗体価を測定した。

β -アミロイド（1-40）を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.1（第1図参照）を用いて得られた結果を〔第5図(a)〕に示した。これらも含め計2種類のハイブリドーマを選択した〔第1表〕。

第 1 表

抗 β -アミロイド (25-35)および(1-40)モノクローナル抗体の反応特異性

反 応 性 1)					
ハイブリドマ株 No.	免疫原	$\beta A(1-40)$	$\beta A(1-28)$	$\beta A(25-35)$	備考
1	$\beta A(1-40)$	±	—	—	BA-27
2	"	±	—	—	
3	$\beta A(25-35)$	±	—	+	
4	"	±	—	+	
5	"	±	—	+	BS-85
6	"	±	—	+	
7	"	±	—	+	

1) 100 nMの抗原[$\beta A(1-40)$ 、 $\beta A(1-28)$ 、 $\beta A(25-35)$]が存在した時+ : $(B/B_0) < 0.50$ ± : $0.50 \leq (B/B_0) < 0.90$ — : $0.90 \leq (B/B_0)$ ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合した β -Gal標識化 $\beta A(1-40)$ 量B₀ : 抗原非存在時の抗体に結合した β -Gal標識化 $\beta A(1-40)$ 量

β-アミロイド(25-35)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.8(第2図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(b)〕に示した。これらも含め計5種類のハイブリドーマを選択した〔表1〕。

β-アミロイド(1-16)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例としてマウスNo.5(第3図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(c)〕に示した。これらも含め当初ハイブリドーマ8株を選択し、さらにその後ハイブリドーマ16株を新たに選択した〔第2表〕。

β-アミロイド(35-43)を免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.4(第4図参照)を用いて得られた結果を〔第5図(d)〕に示した。これらを含め計18種類のハイブリドーマを選択した〔第3表〕。さらに、β-アミロイド(18-28)を免疫したマウス由来のハイブリドーマをスクリーニングし、計9種類のハイブリドーマを選択した〔第4表〕。

第 2 表

抗 β -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体の反応性

反 応 性 1)				
ハイブリドマ株 No.	$\beta A(1-40)$	$\beta A(1-28)$	$\beta A(1-16)$	備考
1	+	+	+	BAN-052
2	+	+	+	BAN-11
3	+	+	+	BAN-30
4	±	—	+	
5	±	±	+	
6	+	+	+	BAN-20
7	—	—	+	
8	—	—	+	
9	+	—	+	BAN-40
10	+	+	+	
11	+	+	+	
12	+	+	+	BAN-50
13	+	±	+	
15	+	+	+	
16	±	±	+	
17	+	+	+	
18	+	+	+	
19	+	+	+	
20	±	—	+	
21	—	—	+	
22	+	+	+	
23	±	±	+	
24	±	—	+	

1) 100 nMの抗原[$\beta A(1-40)$ 、 $\beta A(1-28)$ 、 $\beta A(1-16)$]が存在した時

＋ : $(B/B_0) < 0.50$

± : $0.50 \leq (B/B_0) < 0.80$

－ : $0.80 \leq (B/B_0)$

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(1-16)$ 量

B₀ : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(1-16)$ 量

第 3 表

抗 β -アミロイド(35-43)モノクローナル抗体の反応性

反応性 1)				
ハイブリドーマ株 No.	β A(35-43)	脳画分	クラス/サブクラス	備考
1	+	—		
2	±	—		
3	+	—	IgA, κ	BC-25
4	+	—	IgG3, κ	BC-35
5	+	+	IgG1, κ	BC-05
6	+	—		
7	+	+	IgG1, κ	BC-15
8	+	±	IgG3, κ	BC-65
9	+	—		
10	+	±		
11	+	+	IgG1, κ	BC-75
12	+	±		
13	+	—	IgM, κ	BC-95
14	+	±		
15	+	+	IgG1, κ	BC-55
16	+	±		
17	+	—		
18	+	—		

1) 500 ng/mlの β A(35-43)あるいは100 μ g/mlのアルツハイマー病患者脳抽出物が存在したとき

＋ : $(B/Bo) < 0.6$

± : $0.6 \leq (B/Bo) < 0.8$

－ : $0.8 \leq (B/Bo)$

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 β A(35-43)量

Bo : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 β A(35-43)量

第 4 表

抗 β -アミロイド(18-28)モノクローナル抗体の反応性

反応性 1)				
ハイブリドマ株 No.	$\beta A(17-28)$	$\beta A(18-28)$	$\beta A(1-28)$	備考
1	+	+	-	
2	-	+	-	BP-01
3	-	+	-	BP-02
4	+	+	-	BP-03
5	\pm	+	-	
6	+	+	-	BP-90
7	-	+	-	
8	-	+	-	
9	\pm	+	-	

1) 500ng/mlの $\beta A(17-28)$ 、 $\beta A(18-28)$ あるいは $1\mu g$ の $\beta A(1-28)$ が存在したとき

+: $(B/Bo) < 0.6$

\pm : $0.6 \leq (B/Bo) < 0.8$

-: $0.8 \leq (B/Bo)$

ただし、B: 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(18-28)$ 量

Bo: 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化 $\beta A(18-28)$ 量

次に、これらのハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞としてBALB/Cマウスの胸腺細胞をウェル当り 5×10^5 個になるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル0.5mlを腹腔内投与されたマウス(BALB/C)に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル/匹を腹腔内投与したのち、6～20日後に抗体含有腹水を採取した。

モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。即ち、腹水6～20mlを等量の結合緩衝液(3.5M NaCl、0.05%NaN₃を含む1.5Mグリシン、pH9.0)で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン-A-アガロース(Repligen社製)カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液(0.05%NaN₃を含む0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0)で溶出した。溶出液はPBSに対して4℃、2日間透析したのち、0.22μmのフィルター(ミリポア社製)により除菌濾過し4℃あるいは-80℃で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体結合固相を用いるエンザイム-リンクトイムノソーベントアッセイ(ELISA)法を行った。すなわち、抗体2μg/mlを含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。上記実施例5で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をブロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット(Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製)を用いるELISAによって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。

〔実施例7〕競合法酵素免疫測定法

(1) 競合法-EIA(その1)

β-アミロイド(1-40)あるいはβ-アミロイド(25-35)

を免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例 5

(1) または実施例 5 (2) 記載の方法により調べ、競合法-EIA に用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約 40% となる抗体濃度 (約 3~15 ng/ml) を決定した。次に、上記実施例 5 記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファー A で希釈された抗体溶液 50 μ l、 β -アミロイドあるいは β -アミロイド部分ペプチド、すなわち β -アミロイド (1-40) (以下、免疫測定法用の β -アミロイド (1-40) はBachem 社より購入したものを使用)、 β -アミロイド (1-28) (Peninsula 社より購入) および β -アミロイド (25-35) のバッファー A 溶液 50 μ l、および上記実施例 4 (1) 記載 β -Gal 標識化 β -アミロイド (1-40) (バッファー A で 100 倍希釈) を 50 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。反応後、PBS で洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例 5 (2) 記載の方法により測定した。結果を [第 1 表] に示す。いずれの抗体も β -Gal 標識化 β -アミロイド (1-40) と反応し、また β -アミロイド (1-40) に対しても反応性を有していた [第 1 表]。

典型例として、 β -アミロイド (1-40) あるいは β -アミロイド (25-35) に対するモノクローナル抗体として、それぞれ BA-27a (IgG2a, κ) あるいは BS-85a (IgG1, κ) を用いた場合の競合法-EIA の結果を [第 6 図] に示した。BA-27a の β -アミロイド (1-40) の標準曲線から、 $(B/B_0) = 0.5$ を与える β -アミロイド (1-40) 濃度は、200 nM、40 ng/well であることが分かった。また、この抗体は β -アミロイド (1-16)、 β -アミロイド (1-28) および β -アミロイド (25-35) に

対しては交差反応性を示さないことから、 β -アミロイドのC端側の部分ペプチドに反応するものの、 β -アミロイド(25-35)の部分構造を認識するものではないことが分かった〔第6図(a)〕。一方、BS-85aの β -アミロイド(25-35)の部分構造に対する反応性($(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 20 nM、1 ng/well)は、 β -アミロイド(1-40)に対する反応性($(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 800 nM、160 ng/well)の40倍であることが分かった〔第6図(b)〕。

(2) 競合法-EIA (その2)

抗 β -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体の反応特異性を同様の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例5(3)記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約40%となる抗体濃度(約30~50 ng/ml)を決定した。次に、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50 μ l、 β -アミロイドあるいは β -アミロイド部分ペプチド、すなわち β -アミロイド(1-40)、 β -アミロイド(1-28)、[Cys¹⁷] β -アミロイド(1-16)のバッファーC溶液50 μ l、および上記実施例4(2)記載HRP標識化 β -アミロイド(1-16)(バッファーCで2000倍希釈)を50 μ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例5(3)記載の方法により測定した。結果を〔第2表〕に示す。当初選択したモノクローナル抗体8種類のうちのうち4種類が β -アミロイド(1-40)とも比較的強く反応し、さらにその後新たに選択したモノクローナル抗体16種類のうち10種類が β -アミロイド(1-40)とも比較的強く反応した〔第2表〕)。典型例として、これらの中で

β -アミロイド (1-40) に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体 BAN-052a (IgG1, κ) および BAN-50a (IgG1, κ) の競合法-EIAの結果を〔第7図〕に示す。これらの抗体が β -アミロイド (1-40)、 β -アミロイド (1-28)、 β -アミロイド (1-16) に対して同程度の反応性を有することが分かる。また、〔第8図〕に、これら2種類の抗体に加え、当初選択した β -アミロイド (1-40) に対して高い反応性を示したモノクローナル抗体3種類、BAN-11a (IgG1, κ)、BAN-20a (IgG1, κ) および BAN-30a (IgG1, κ) を用いた競合法-EIAにおける β -アミロイド (1-40) の標準曲線を示した。これらの抗体の $(B/B_0) = 0.5$ を与える β -アミロイド (1-40) 濃度は $25 \sim 70 \text{ nM}$ ($5 \sim 15 \text{ ng/well}$) の範囲内にあり、抗体間で3倍未満の差しか認められなかった。そのなかで、BAN-50a を用いる競合法-EIAが最も高感度であり、約 0.6 ng/well [$(B/B_0) = 0.9$] の β -アミロイド (1-40) を検出可能であった。

(3) 競合法-EIA (その3)

アルツハイマー病患者脳 10 g より、森らの方法 (本文参照) に従って β -アミロイド画分 (蟻酸抽出物) 0.1 g を得た。次に、上記実施例7 (2) 記載の方法に従って、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレート、抗体溶液、 β -アミロイドまたはその部分ペプチド、すなわち β -アミロイド (1-40)、 $[\text{Cys}^{34}] \beta$ -アミロイド (35-43)、あるいは上記アルツハイマー病患者脳由来 β -アミロイド画分、および上記実施例4 (3) 記載HRP標識化 β -アミロイド (35-43) (バッファーCで50倍希釈) を反応させた。結果を〔第3表〕に示す。当初選択したモノクローナル抗体のうち、4種類がアルツハイ

マー病患者脳由来 β -アミロイド画分と比較的強く反応した。これらの中から、高い抗体価を示したモノクローナル抗体BC-05a (IgG 1, κ) を選択し、以下の実験に用いた。

(4) 競合法EIA (その4)

抗 β -アミロイド(18-28)モノクローナル抗体の反応特異性を上記実施例7(2)記載の方法により調べた。すなわち、各抗体濃度を決定したのち、 β -アミロイドあるいは β -アミロイド部分ペプチドとして β -アミロイド(1-40)、[Cys²⁹] β -アミロイド(17-28) (アコード社製)、[Cys²⁹] β -アミロイド(18-28) および β -アミロイド(1-28)を用い、標識化抗原として上記実施例4(4)記載HRP標識化 β -アミロイド(18-28) (バッファーCで1000倍希釈)を用いて反応させ、反応後の酵素活性を測定した。結果を[第4表]に示す。選択した9種類の抗体はいずれも、抗原である β -アミロイド(18-28)と高い反応性を有しており、さらにそのうち5種類の抗体は β -アミロイド(17-28)とも比較的強く反応した。いずれの抗体も β -アミロイド(1-28)および β -アミロイド(1-40)とは反応しなかった。

これらのうち、 β -アミロイド(17-28)および β -アミロイド(18-28)の両者と高い反応性を有するモノクローナル抗体BP-90a (IgG 1, κ) を今後の実験で主に用いることとした。

[実施例8] HRP標識化抗 β -アミロイドモノクローナル抗体の作製

(1) BS-85a-HRP

BS-85a精製画分4.2mg (28nmol)を含む0.1Mリン酸緩衝液、pH6.8溶液にGMBS420nmolを含むDMF50 μ lを加え、室温で40分反応させた。反応液をセファデックスG-25カラム(溶離液、0.1Mリン酸緩衝液、pH6.7)で分離し、

マレイミド基の導入された抗体画分 3 mg を得た。次に、HRP 12 mg (300 nmol) を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (0.15 M NaCl も含む)、pH 6.8、1.4 ml に SPDP 4.5 μ mol を含む DMF 50 μ l を加え、室温で 40 分反応させた。次に、68 μ mol のジチオスレイトールを含む 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.5 ml を加え、室温で 20 分反応させた後セファデックス G-25 カラム (溶離液、2 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6) で分離し、SH 基の導入された HRP 8 mg を得た。次に、SH 基の導入された HRP 8 mg とマレイミド基の導入された抗体画分 3 mg とを混合し、コロジオンバッグ (ザルトリウス社製) で約 0.3 ml にまで濃縮したのち、4℃で 16 時間放置した。反応液を溶離液に 0.1 M リン酸緩衝液、pH 6.5 を用いる ウルトロゲル AcA 34 カラムに供し、BS-85a-HRP 複合体画分を精製した。

(2) BA-27a-HRP

同様の方法により、BA-27a 精製画分 4.7 mg と HRP 14 mg を用いて BA-27a-HRP 複合体を作製した。

(3) BAN-052a-HRP

同様の方法により、BAN-052a 精製画分 5 mg と HRP 14 mg を用いて BAN-052a-HRP 複合体を作製した。

(4) BC-05a-HRP

同様の方法により、BC-05a 精製画分 5 mg と HRP 14 mg とを用いて BC-05a-HRP 複合体を作製した。

〔実施例 9〕 サンドイッチ法-EIA (1)

(1) BS-85a-HRP を用いる サンドイッチ法-EIA

上記実施例 6 記載の精製したモノクローナル抗体 BAN-052a、BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a、BS-85a また

はBA-27aを $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む 0.1M 炭酸緩衝液、 $\text{pH}9.6$ 溶液を96ウェルマイクロプレートに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位をPBSで4倍希釈したブロックエース $300\mu\text{l}$ を加え不活化した。

以上のように調製したプレートに、バッファーE〔 10% ブロックエース、 0.2% BSA、 0.4M NaCl、 0.05% CHAPS、 0.05% NaN₃を含む 0.02M リン酸緩衝液、 $\text{pH}7$ 〕で希釈した β -アミロイド(1-40)標準液 $100\mu\text{l}$ を加え、 4°C で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8(1)で作製したBS-85a-HRP(バッファーCで 1500 倍希釈) $100\mu\text{l}$ を加え、 4°C で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例5(3)記載の方法によりTMBを用いて固相上の酵素活性を測定した(酵素反応20分)。結果を〔第9図〕に示す。実施例7に記したように、BS-85aの競合法EIAにおける β -アミロイド(1-40)に対する反応性は高いものではなかった。しかし、上記のように β -アミロイド(1-16)を免疫原とするモノクローナル抗体を固相に用いるサンドイッチ法-EIAの標識抗体として用いる場合には、極めて高感度に β -アミロイド(1-40)を検出することがわかった。特に、BAN-052aの固相を用いたとき、他の3種類の抗体固相と比較して $10\sim30$ 倍高感度であり、 $3\text{pg}/\text{well}$ の β -アミロイド(1-40)を検出することが可能であった。

(2) BA-27a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIA

同様に、BAN-052a、BAN-11a、BAN-20a、BAN-30a、BS-85aまたはBA-27aを固定したマイクロプレートに β -アミロイド(1-40)標準液 $100\mu\text{l}$ を加え、 4°C で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8(2)で作製

したBA-27a-HRP（バッファーCで2500倍希釈）100 μ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBにより測定した（酵素反応20分）。結果を〔第10図〕に示す。BS-85aの場合と同様、BA-27aも競合法EIAにおいては β -アミロイド（1-40）に対し高い反応性を示さなかった。しかし、上記のようなサンドイッチ法-EIAの標識抗体として用いる場合には、BS-85aよりもさらに高感度に β -アミロイド（1-40）を検出することがわかった。特に、BAN-052aの固相を用いたとき、他の3種類の抗体固相と比較して約30倍高感度であり、0.6 pg/wellの β -アミロイド（1-40）を検出することが可能であった。

（3）BAN-052a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIA

BS-85aまたはBA-27aを固定したマイクロプレートに β -アミロイド（1-40）標準液100 μ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、上記実施例8（3）で作製したBAN-052a-HRP（バッファーCで2500倍希釈）100 μ lを加え、4℃で24時間反応させた。PBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBにより測定した（酵素反応20分）。結果を〔第11図〕に示す。このように、実施例8（2）とは逆の系、すなわち、BS-85aまたはBA-27aのC端抗体を固相とし、BAN-052aのN端抗体を標識体とするサンドイッチ-EIAにおいても、それぞれ約80 pg/wellおよび10 pg/wellの β -アミロイド（1-40）を検出することが可能であった。

また、BAN-052aを固相とするサンドイッチ-EIAにおいて、標識体にもBAN-052a-HRPを用いた場合（バッファーCで1000倍希釈）には、BA-27a-HRPを用いた場合（バッファー

Cで1500倍希釈)と比較して、検出感度が1/100以下となることから、本発明で用いている実験条件下では多量体の β -アミロイド(1-40)はほとんど存在しないことが示唆される〔第12図〕。

〔実施例10〕 サンドイッチ法-EIA(2)

抗 β -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体のなかで、BAN-052aが群を抜いて高感度のサンドイッチ-EIAを与えたことから、サンドイッチ-EIAにより適した抗 β -アミロイド(1-16)モノクローナル抗体を選択すべくさらに16種類の抗体を作製した〔第2表〕。その結果、BAN-50aを得ることができた。〔第13図〕および〔第14図〕にBAN-50aを固相抗体とするサンドイッチ-EIAの結果を示した。アッセイ方法は上記実施例9(3)に従ったが、標識体濃度としてBS-85a-HRPは1000倍希釈〔第13図〕、BA-27a-HRPは1500倍希釈〔第14図〕を用いた。また、これら測定系の特異性を調べるため、 β -アミロイド(1-28)に対する反応性も検討した〔図中で●および▲が β -アミロイド(1-40)に対する反応性を、また○および△が β -アミロイド(1-28)に対する反応性を示す〕。その結果、いずれの標識体を用いても、BAN-50a固相を用いた場合にはBAN-052a固相を用いた場合と比較して2~3倍高感度であり、BA-27a-HRP標識体と組み合わせたとき0.2pg/wellの β -アミロイド(1-40)を検出可能であった。また、いずれの測定系も β -アミロイド(1-28)を検出せず、 β -アミロイド(1-40)に特異的であることが分かった。

〔実施例11〕 サンドイッチ法-EIA(3)

(1) BS-85a-HRPまたはBA-27a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性

実施例10に示したようにBAN-50aを固相抗体として用い、標

標識体としてBS-85a-HRPまたはBA-27a-HRPを用いる2種類のサンドイッチ法-EIAの測定系の特異性をさらに詳しく検討した。アッセイ方法は上記実施例10に従ったが、標識体濃度としてBS-85a-HRPは670倍希釈、BA-27a-HRPは1000倍希釈を用い、 β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)、 β -アミロイド(1-40)、 β -アミロイド(1-42)および β -アミロイド(1-28)に対する反応性を調べた(〔第15図〕(a)、(b))。ここで、 β -アミロイド(1-38)および β -アミロイド(1-39)は実施例1(5)で作製したものをを用いた。実施例1(5)で β -アミロイド(1-38)および β -アミロイド(1-39)に対応した逆相HPLCの溶出面分中のそれぞれの濃度は、実施例7(2)の方法に従い、BAN050aを用いる競合法EIAにより決定した。その結果、標識体としてBS-85a-HRPを用いた測定系は(〔第15図〕(a))、 β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)、および β -アミロイド(1-40)をほとんど同一の感度(0.7 pg/well)で検出し、 β -アミロイド(1-42)については上記の3種の β -アミロイドに対する感度と比較して1/2から1/3の感度で検出することがわかった。また、 β -アミロイド(1-28)は全く検出せず、実施例10と同様の結果を得た。一方、標識体としてBA-27a-HRPを用いた測定系は(〔第15図〕(b))、 β -アミロイド(1-40)、 β -アミロイド(1-42)をそれぞれ0.2 pg/well、18 pg/wellの感度で検出した。また、 β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)についてはそれぞれ85 pg/well、17 pg/wellの検出が可能であった。

以上の結果から、標識体としてBS-85a-HRPを用いた測定系は β -アミロイドのC端部に非特異的であり、標識抗体の免疫原として

用いた部分ペプチドである β -アミロイド(25-35)の配列を含む β -アミロイドに対しては、ほぼ同等の感度を有することがわかった。一方、標識体としてBA-27a-HRPを用いた測定系は β -アミロイド(1-40)のC末端に特異的と考えられ、 β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)および β -アミロイド(1-42)に対しては2%以下の交差反応性で弱く反応することがわかった。

(2) BC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性と感度

固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体として上記実施例8(4)で作製したBC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性および感度を調べた。上記実施例11(1)と同様にして β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)、 β -アミロイド(1-40)、 β -アミロイド(1-42)および β -アミロイド(1-28)に対する反応性を調べたが、標識体濃度としては200倍希釈のものを用いた(〔第15図〕(c))。その結果、このBC-05a-HRPを用いたサンドイッチ法-EIAは、0.7 pg/wellの β -アミロイド(1-42)を検出することが可能だったが、 β -アミロイド(1-42)以外の4種の β -アミロイド、すなわち β -アミロイド(1-38)、 β -アミロイド(1-39)、 β -アミロイド(1-40)および β -アミロイド(1-28)は全く検出しなかった。したがって、固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体としてBC-05a-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAは、 β -アミロイド(1-42)を極めて高感度にかつ極めて選択的に検出することが可能であるとわかった。

以上の結果から、固相抗体としてBAN-50aを用い、標識体としてBA-27a-HRPまたはBC-05a-HRPを用いる2種類の

測定系を組み合わせることにより、 β -アミロイド (1-40) および β -アミロイド (1-42) の分別定量ができることがわかった。

〔実施例 12〕モノクローナル抗体固定化アフィニティ固相の作製

(1) BAN-052a 固定化アフィニティ固相の作製

BAN-052a を充填剤に固定化することにより、アフィニティ固相を作製した。即ち、BAN-052a 45 mg と TSK gel AF-トレシルトヨパール 650M (東ソー株式会社製) 5 g とを 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液中、4℃で一晩反応させた。反応後、0.5 M の食塩水で洗浄し、余剰の活性基をふさぐため、0.5 M NaCl 含有 0.1 M トリシュー塩酸 (pH 8.0) 中、室温で 1 時間反応させた。得られた BAN-052a-トレシルトヨパール 25 ml は PBS で洗浄後、バッファー E 中、4℃で保存した。

(2) BA-27a 固定化アフィニティ固相の作製

上記 (1) と同様にして、BA-27a を充填剤に固定化することによりアフィニティ固相を作製した。すなわち、BA-27a 15 mg と TSK gel AF-トレシルトヨパール 650M 2 g とを反応させ、10 ml の BA-27a-トレシルトヨパールを得た。

〔実施例 13〕アルツハイマー病患者脳脊髄液中の β -アミロイドの分析

上記実施例 12 (1) で作製した BAN-052a 固定化アフィニティ固相により精製したアルツハイマー病患者の脳脊髄液を逆相-HPLC で分画し、サンドイッチ-EIA によって分析した。

まず、アルツハイマー病患者の脳脊髄液 1.5 ml をバッファー E で 2 倍に希釈後、BAN-052a-トレシルトヨパール充填カラム (0.8×0.3 cm) より溶出し部分精製した。溶離液には、0.2% トリフルオロ酢酸含有 60% アセトニトリルを用いた。次に、この溶出画分を

濃縮後、実施例1（5）記載の方法によりVydac C4を用いる逆相-HPLCによって分離し、実施例10記載のBAN-50a結合固相とBS-85a-HRPあるいはBA-27a-HRPとを用いるサンドイッチ-EIAで溶出画分中の β -アミロイドを定量した。結果を〔図16〕に示す。分画No. 59は、合成 β -アミロイド（1-40）の溶出位置にほぼ一致したため、〔第16図〕（a）（b）で共に検出された免疫活性は β -アミロイド（1-40）に対するものと考えられた。従って、〔第16図〕の結果から、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中には高濃度の β -アミロイド（1-40）が存在することが明らかとなったが、さらに〔第16図〕（a）からBS-85a-HRPのみで検出可能な分子種も少量含まれていることがわかった（分画No. 47およびNo. 48）。これらの溶出位置は、 β -アミロイド（1-40）の溶出位置よりもアセトニトリル濃度が低いため、分画No. 47およびNo. 48で溶出されるのは β -アミロイド（1-40）よりもより親水性の分子種であると考えられる。実施例11の結果より、標識体としてBS-85a-HRPを用いる測定系は、 β -アミロイド（1-40）のC末端から1、2残基欠落した分子種に対しても β -アミロイド（1-40）と同等の感度を有することが示された。従って、分画No. 47およびNo. 48に見られる免疫活性は、 β -アミロイド（1-40）のC端部が欠落した分子種に対するものである可能性が高い。

〔実施例14〕アルツハイマー病患者脳由来 β -アミロイド画分の分析
上記実施例7（3）記載のアルツハイマー病患者脳由来 β -アミロイド画分（ギ酸抽出物）11mgをギ酸に溶解し、TSKG3000PWを用いるゲルろ過により分離した。

カラム条件

カラム：TSK G3000PW（東ソー株式会社製）

溶離液：0.1% トリフルオロ酢酸含有40%アセトニトリル

流速：0.5 ml/分

上記実施例10記載のBAN-50a抗体結合固相とBS-85a-HRPとを用いるサンドイッチ-EIAで溶出画分中の β -アミロイドを定量した結果、HPLC溶出時間14分から15分の間に強い免疫活性が認められた。次に、この画分に0.05% CHAPSを添加後濃縮し、実施例1（5）記載の方法によりVydac C4を用いる逆相-HPLCにより分離した。溶出結果を〔図17〕に示す。

得られたNo.35およびNo.41-45の画分それぞれを300 μ lずつ濃縮したのち、質量分析（HX110、日本電子社製）に付した。No.35、No.41およびNo.43の画分の分析結果を〔図18〕に示す。No.35は β -アミロイド（1-40）が、No.41は β -アミロイド（1-42）が、また、No.43は β -アミロイド（3-42）（分子量18相当分が不足しているためピログルタミン酸になっていると推測される）が主要な構成成分であり、さらにN端部が欠落した他の分子種が混在していた。また、No.35は合成 β -アミロイド（1-40）の溶出位置に一致した。

次に、上記実施例11記載の方法により、溶出画分の免疫活性を調べた。各画分3 μ lを試料とし、BC-05a-HRPは200倍希釈で用いた。結果を〔第19図〕に示す。BS-85aを用いる測定系ではNo.35およびNo.41-45の両ピークが、BA-27aを用いる測定系では主としてNo.35のピークが、またBC-05aを用いる測定系ではNo.41-45のピークが検出された。

以上の結果は、実施例11で示した各測定系の特異性に基づくものであり、実施例13とともに、本発明による測定系がアルツハイマー病の

診断、病因の解明、およびアルツハイマー病の予防・治療を目的とする医薬品の開発において重要な手段を提供できることを示す。

〔実施例15〕 ヒト型アミロイドタンパク質前駆体 (APP) 遺伝子のクローニング

β -アミロイドは巨大な前駆体タンパク質 (APP) のごく一部であり、APPをコードするcDNAはこれまでに5種類見いだされている。APP695、APP714、APP751、APP770、およびAPP563と呼ばれるこれらのcDNAは、同一のAPP遺伝子からオルターナティブスプライシングの結果生じることがわかっている。これらのうちヒト型APP695の高発現用プラスミドDNAを構築するため、ヒトAPP695遺伝子のクローニングを行った。

まず、強力なSR α プロモーター (モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、第8巻、466-472ページ、1988年) を持つプラスミドpME18sをベクターとして、ヒト肺ガン細胞由来の細胞であるMAC10のcDNAライブラリーを作製した。既に報告されているヒトAPPのcDNA塩基配列を基に、タンパク質をコードしている領域より上流側の配列 (センス)

5'-ATCCCACTCGCACAGCAGCGCACTC-3'

(配列番号: 13)

および下流側の配列 (アンチセンス)

5'-TGCTGTCCAACCTTCAGAGGCTGCTG-3'

(配列番号: 14)

の合成DNAを作製し、これをプローブに用いて上記cDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたcDNAをクローニングし、その塩基配列を合成鎖停止法で決定したところ、すべてがAPP751をコードするcDNAであった。そこで、 λ gt10をベクターとして作製

されたヒト胎児脳の cDNAライブラリー (ストラタジーン社) を同様の方法でスクリーニングした結果、APP 695 をコードする cDNA を得た。APP 751 と APP 695 の cDNA の配列はプロテアーゼインヒビター領域を除くと完全に一致しているので、APP 751 の cDNA を持つプラスミド DNA と APP 695 の cDNA を持つファージ DNA を切断し再結合させて、APP 695 の cDNA を SR α プロモーターの下流に結合させたプラスミド DNA を構築した。

〔実施例 16〕 ヒト APP 695 高発現ラット C6 グリオーマ細胞の育種

ラット C6 グリオーマ細胞 (ATCC CCL 107) は、37℃、5% CO₂ 存在下、直径 10 cm の培養用シャーレで、10% ウシ胎児血清を含む DMEM を培地として培養した。上記実施例 15 で構築したヒト APP 695 高発現用プラスミド DNA 20 μ g をネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミド DNA pTB6 (セル・ストラクチャー・アンド・ファンクション、12 巻、205-217 ページ、1987 年) 1 μ g と混合し、80% 飽和まで培養した C6 グリオーマ細胞にリン酸カルシウム共沈殿法を用いて導入した。24 時間後に終濃度 750 μ g/ml のネオマイシン (GIBCO 社) を加えて培養を続け、耐性株を選択した。得られた選択株 18 株をそれぞれ 100 μ l の PBS に懸濁し、凍結融解と超音波処理ののち 8% ポリアクリルアミドゲルで SDS 電気泳動を行った。タンパク質をニトロセルロース膜に転写後、抗ヒト APP マウスモノクローナル抗体 (ベーリンガー・マンハイム社) を用いたウェスタンブロットを行い、APP 695 の発現量が最も高い C6-695-18 を得た。

〔実施例 17〕 ヒト APP 695 高発現 C6 グリオーマ細胞培養上清に含まれる 3 kDa ペプチドの検出

上記実施例 1 6 記載ヒト A P P 6 9 5 高発現 C 6 グリオーマ細胞の培養上清中に含まれる β -アミロイド分子種を同定するため、実施例 1 3 と同様の方法で培養上清を精製し、サンドイッチ E I A によって分析した。すなわち、まず、培養上清 1 リットルを上記実施例 1 2 (2) で得られた B A - 2 7 a - トレシルトヨパール充填カラムを用いて部分精製し、この溶出画分を濃縮後 V y d a c C 4 を用いる逆相 H P L C によって分画した。

カラム条件

カラム : V y d a c C 4 (4.6 x 250 mm)

溶離液 : A 液 (0.1 % トリフルオロ酢酸含有 5 % アセトニトリル)

B 液 (0.1 % トリフルオロ酢酸含有 80 % アセトニトリル)

溶出方法 : 溶離液 B の濃度を最初の 5 分間に 15 % から 25 % まで上昇させ、次に 60 分間かけて 25 - 50 % に直線的に上昇させた。

流速 : 0.5 ml / 分

実施例 9 (1) 記載の方法に従い B P - 9 0 a を固定化した 96 ウェルマイクロプレート、および標識体として B A - 2 7 a - H R P をもちいて、上記の逆相 H P L C 画分のサンドイッチ E I A を行った。強い免疫活性が認められた分画 No. 28 および No. 38 - 39 を濃縮し質量分析を行ったところ、それぞれ β -アミロイド (20 - 40) または β -アミロイド (18 - 40) が主要な構成成分であることがわかった。以上の結果から、B P - 9 0 a および B A - 2 7 a を用いるサンドイッチ E I A 法は、 β -アミロイド C 端側の誘導体を選択的に検出することが可能であるとわかった。従って、本測定系は A P P の代謝を研究する際の

重要な手段を提供するものと考えられる。

産業上の利用可能性

アルツハイマー病患者の脳に特徴的な病変として、老人斑の主要な構成成分の一つである β -アミロイドの沈着が知られている。本発明のモノクローナル抗体を用いることによって、C端部疎水的領域を有する β -アミロイドを感度よく特異的に定量することができ、この定量方法はアルツハイマー病などの診断に有用である。

配列表

配列番号： 1

配列の長さ： 38

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly

35

配列番号： 2

配列の長さ： 39

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20

25

30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val

35

- 82 -

WO 94/17197

配列の長さ：42

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala						
				35				40							

配列番号：6

配列の長さ：42

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
				5					10					15	
Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Ile	Ile
				20				25					30		
Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr					
				35				40							

配列番号：7

配列の長さ：28

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

20

25

配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met

5

10

配列番号：9

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr

5

配列番号： 1 0

配列の長さ： 1 6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

5

10

15

配列番号： 1 1

配列の長さ： 1 2

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

5

10

配列番号： 1 2

配列の長さ： 1 1

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys

5

10

配列番号： 1 3

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

ATCCCACTCG CACAGCAGCG CACTC

25

配列番号： 1 4

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

TGCTGTCCAA CTTCAGAGGC TGCTG

25

請求の範囲

1. β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体。
2. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
3. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
4. 抗体が配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする請求の範囲第1項記載の抗体。
5. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項、第2項、第3項または第4項記載の抗体。
6. 請求の範囲第5項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
7. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応するBAN-052aで標示されるモノクローナル抗体。
8. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび（または）配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするBAN-50aで標示されるモノクローナル抗体。

9. 請求の範囲第7項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

10. 請求の範囲第8項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

11. 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする β -アミロイドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体。

12. 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第11項記載の抗体。

13. 請求の範囲第12項記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

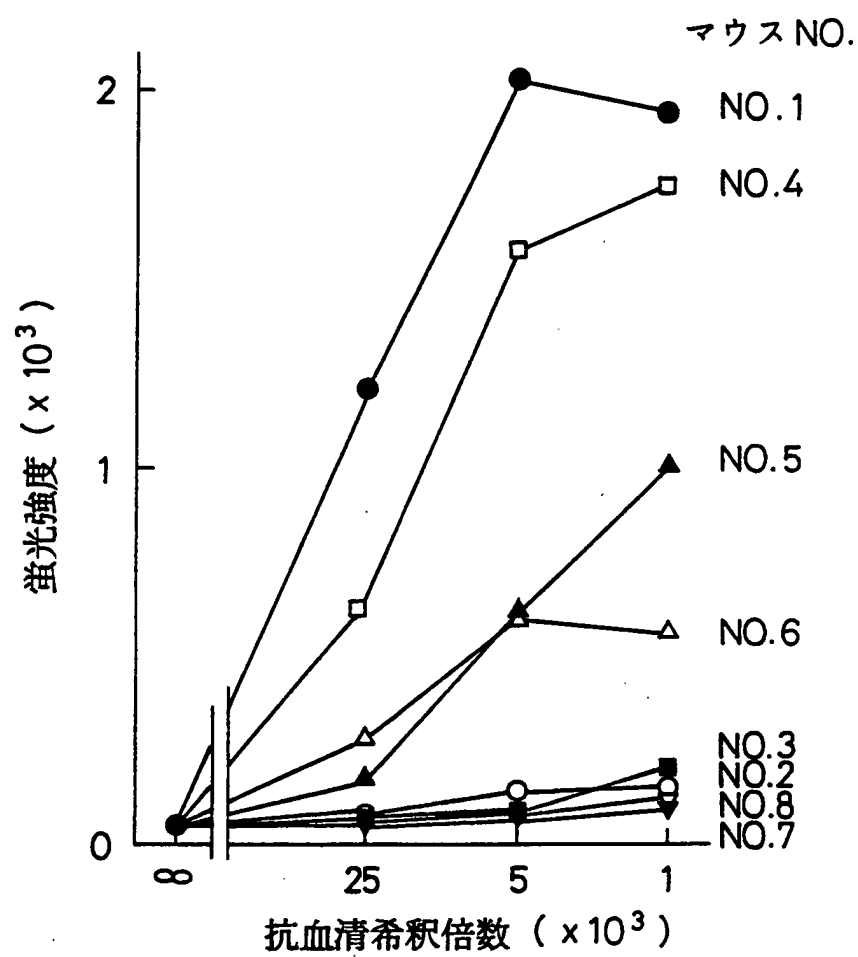
14. 請求の範囲第1項、第7項、第8項または請求の範囲第11項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドまたはその誘導体の定量法。

15. 請求の範囲第1項記載の抗体と、請求の範囲第7項または第8項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドの定量法。

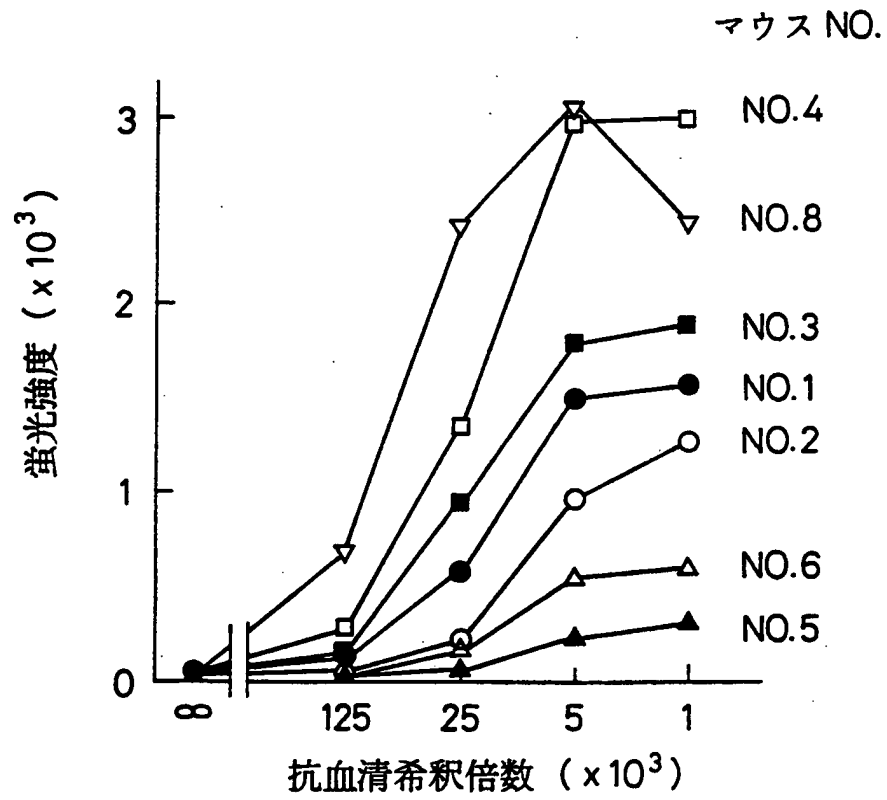
16. 請求の範囲第11項記載の抗体と、請求の範囲第1項、第7項または第8項記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の β -アミロイドの定量法。

17. アルツハイマー病の診断に用いられる請求の範囲第14項、第15項または第16項記載の定量法。

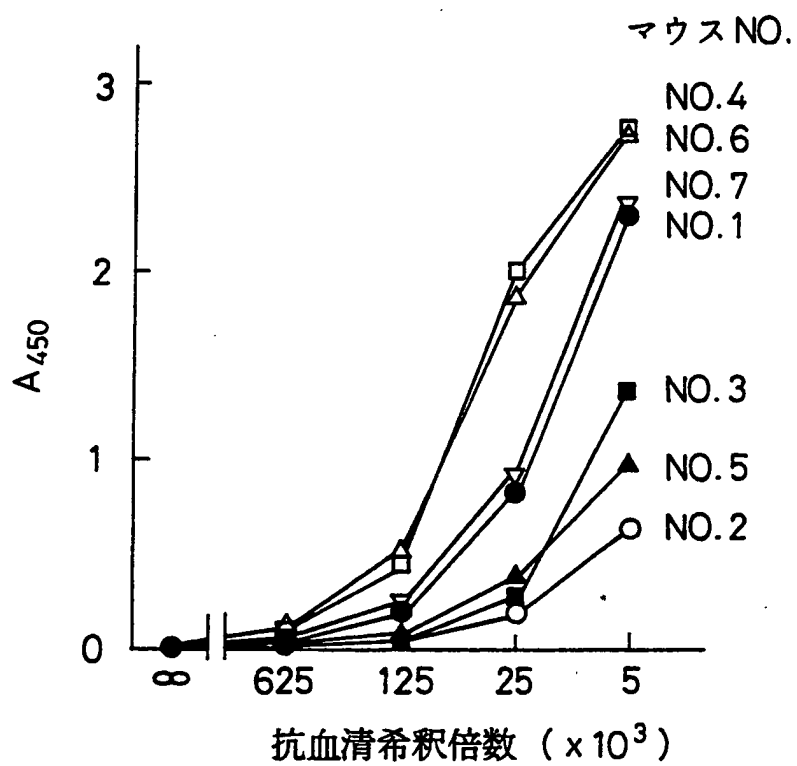
第 1 図



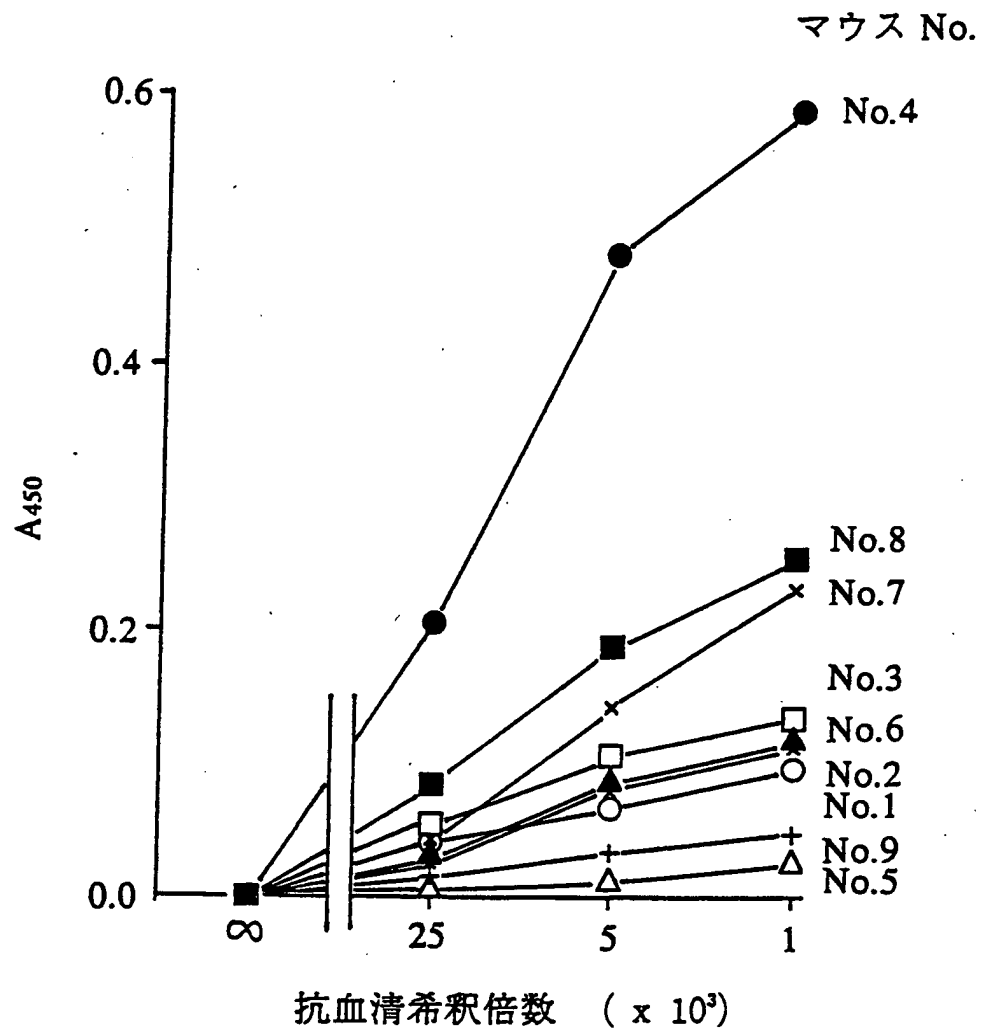
第 2 図



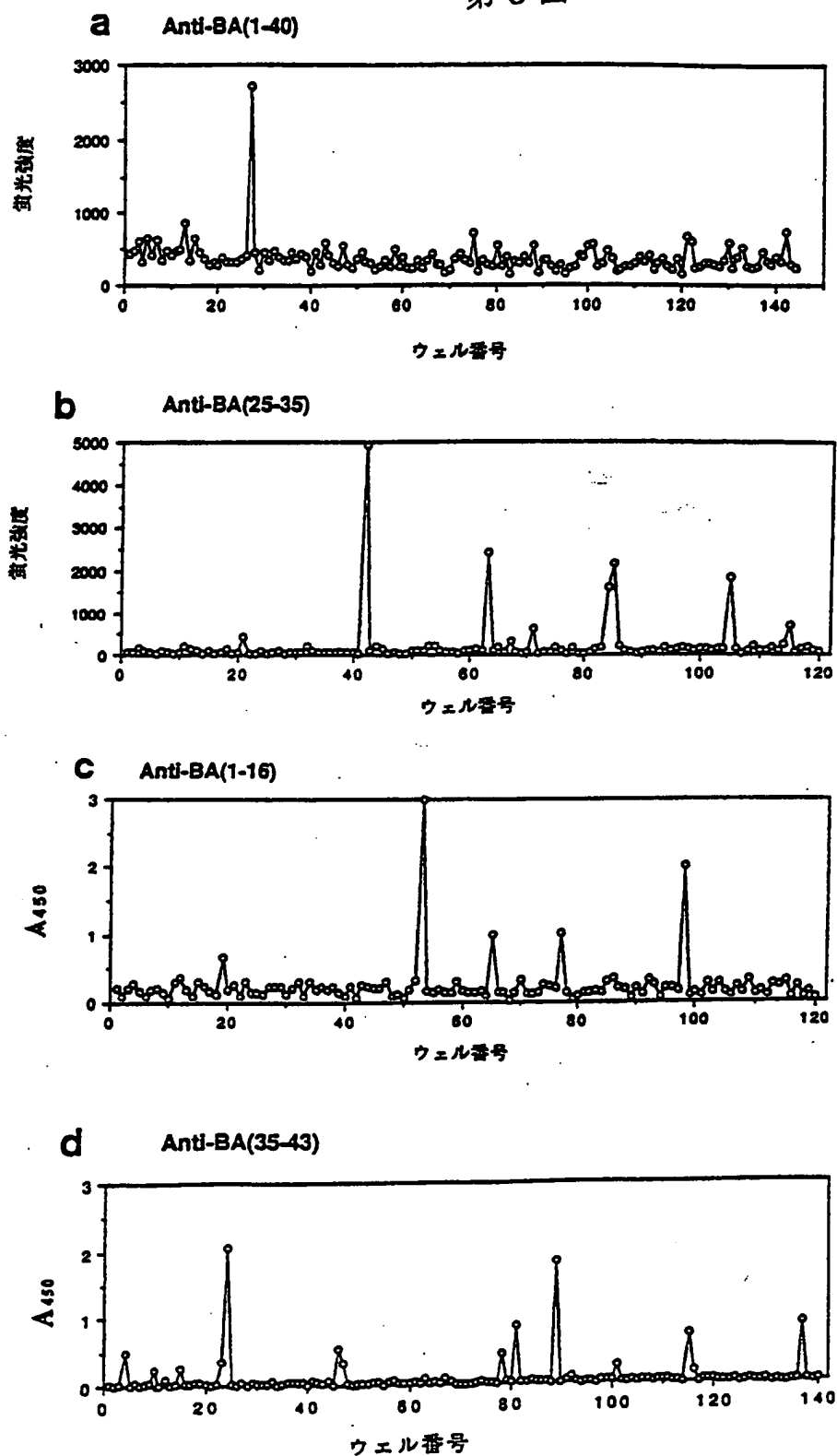
第 3 図



第 4 図

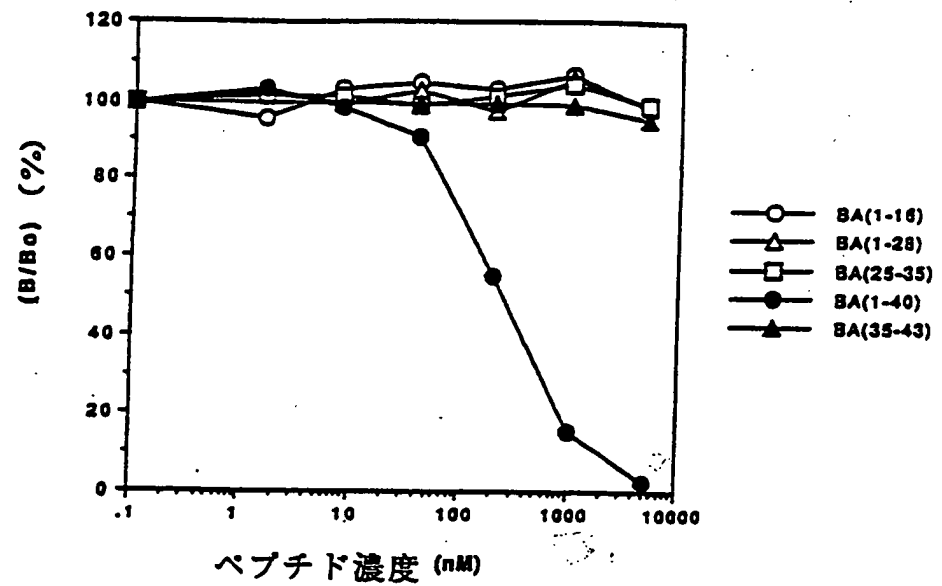


第 5 図

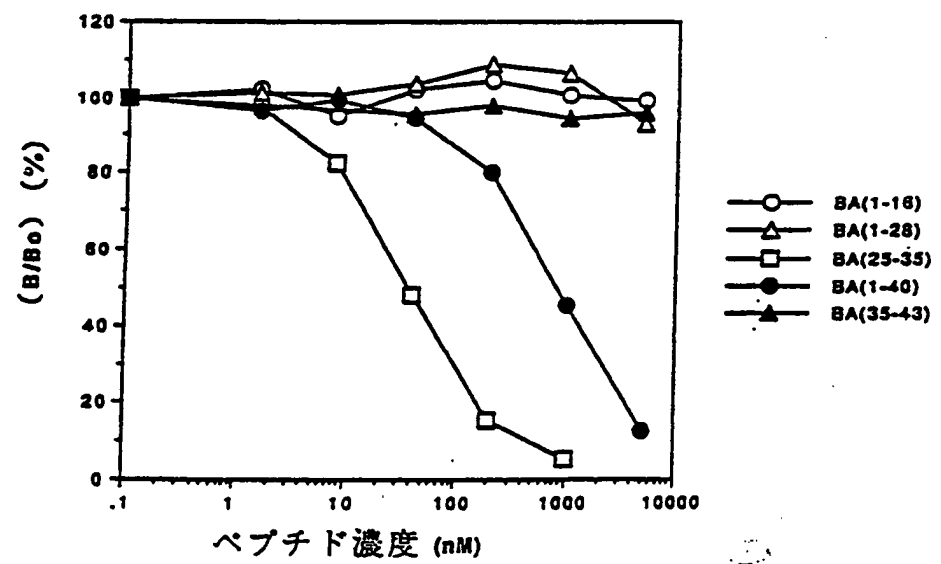


第 6 図

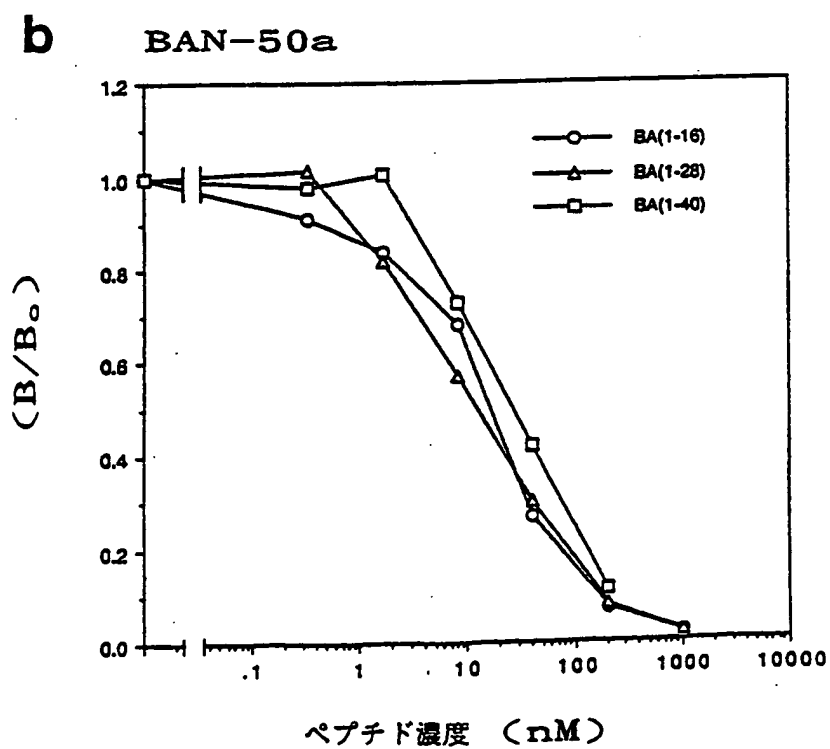
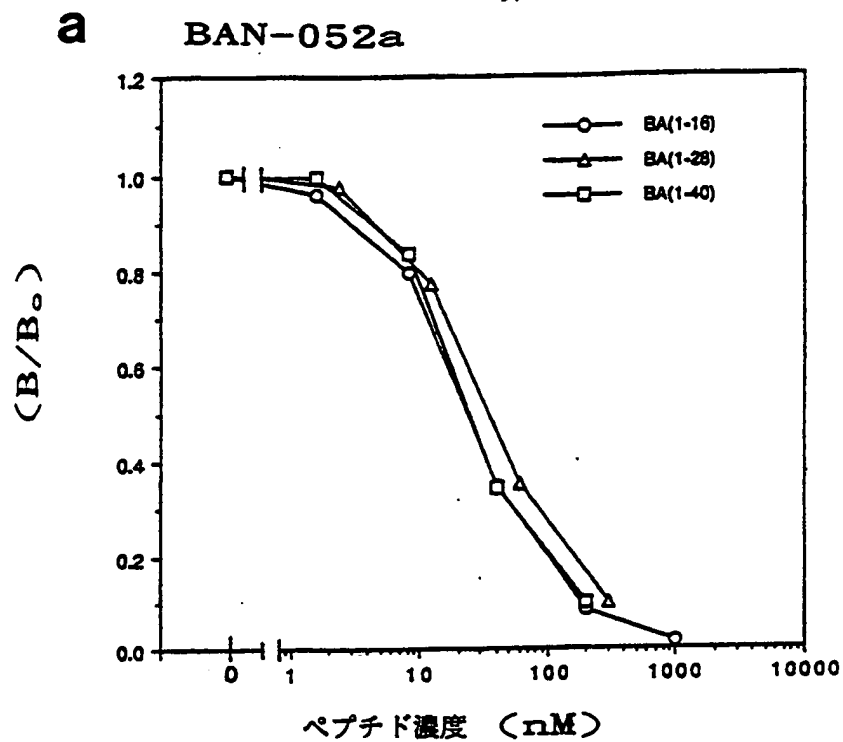
a BA-27a



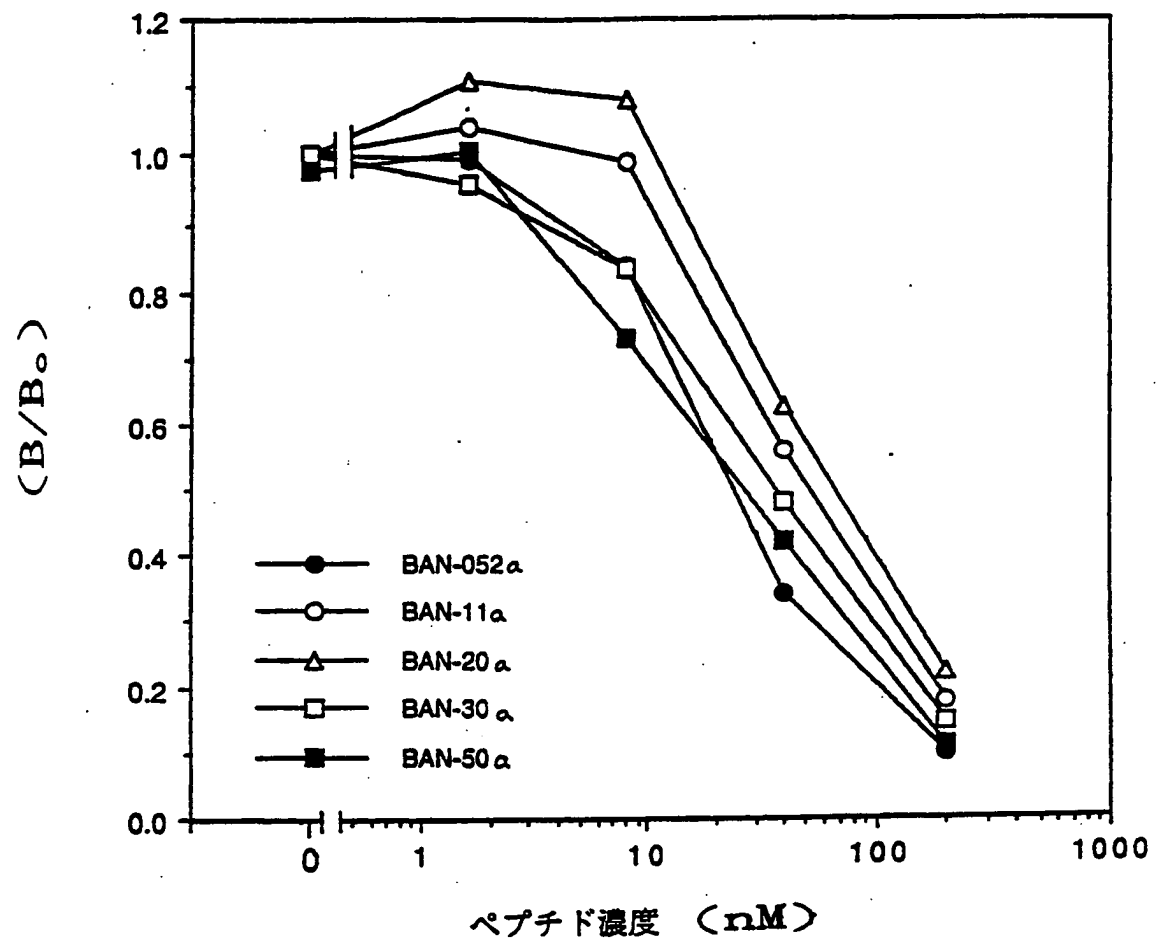
b BS-85a



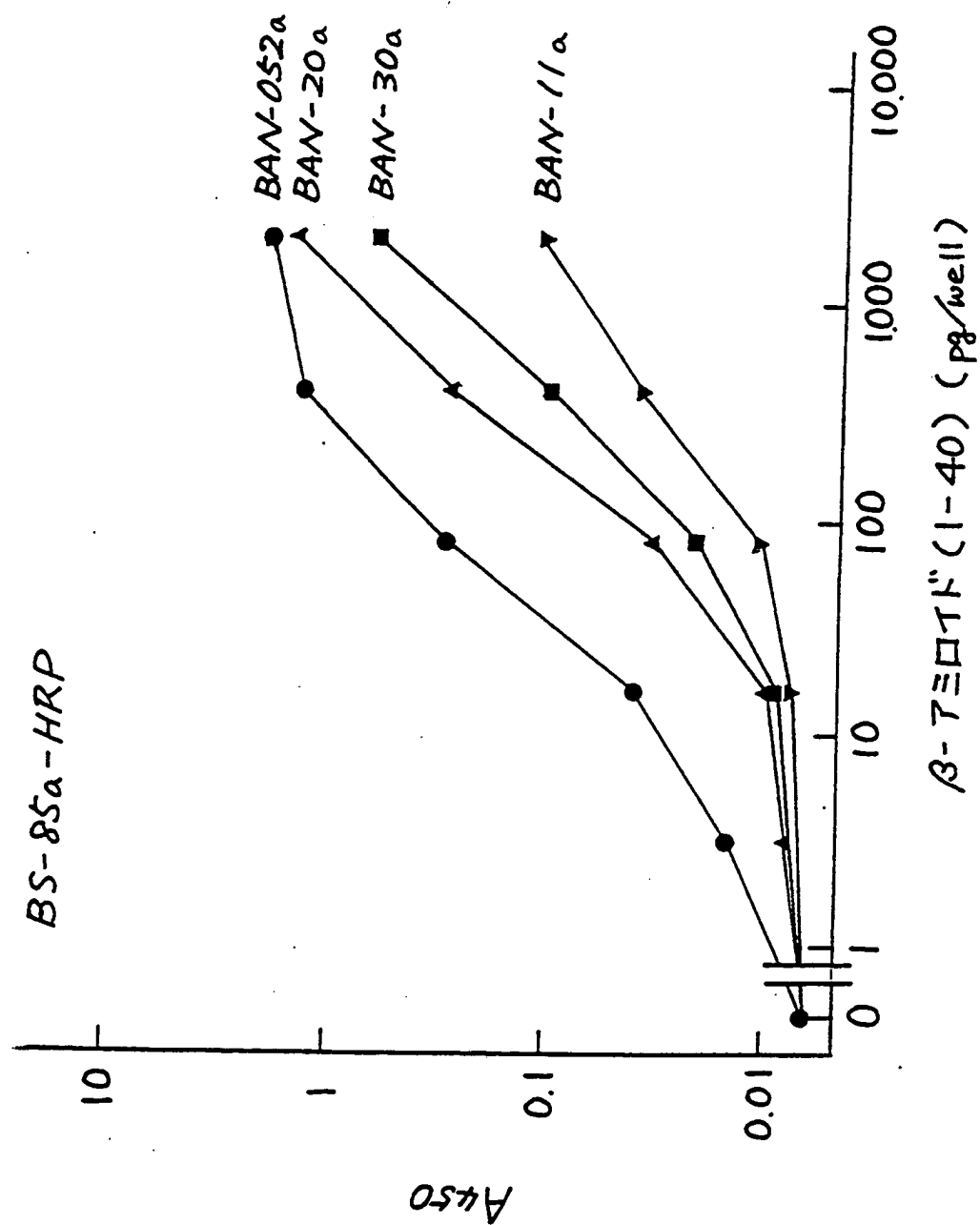
第 7 図



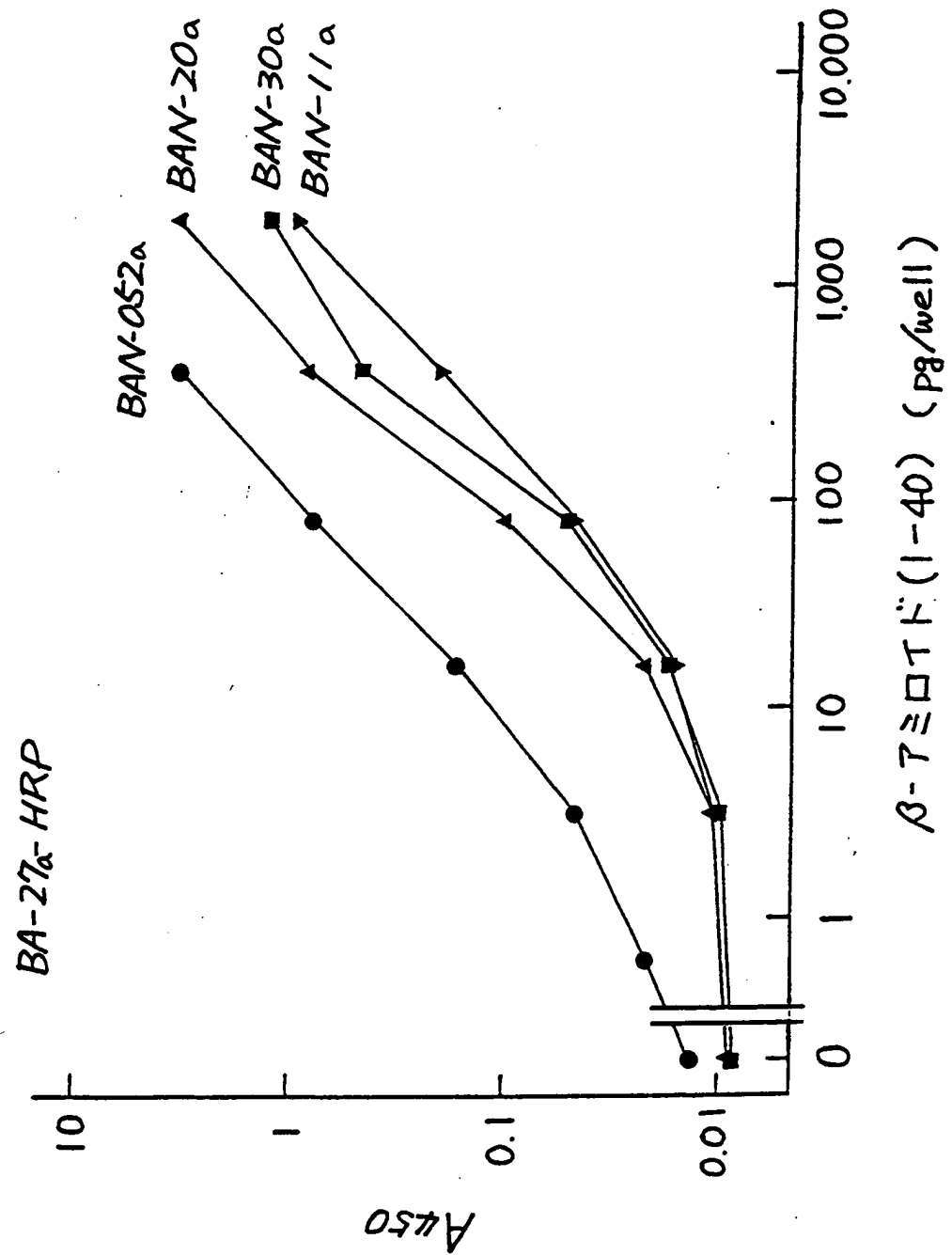
第 8 図



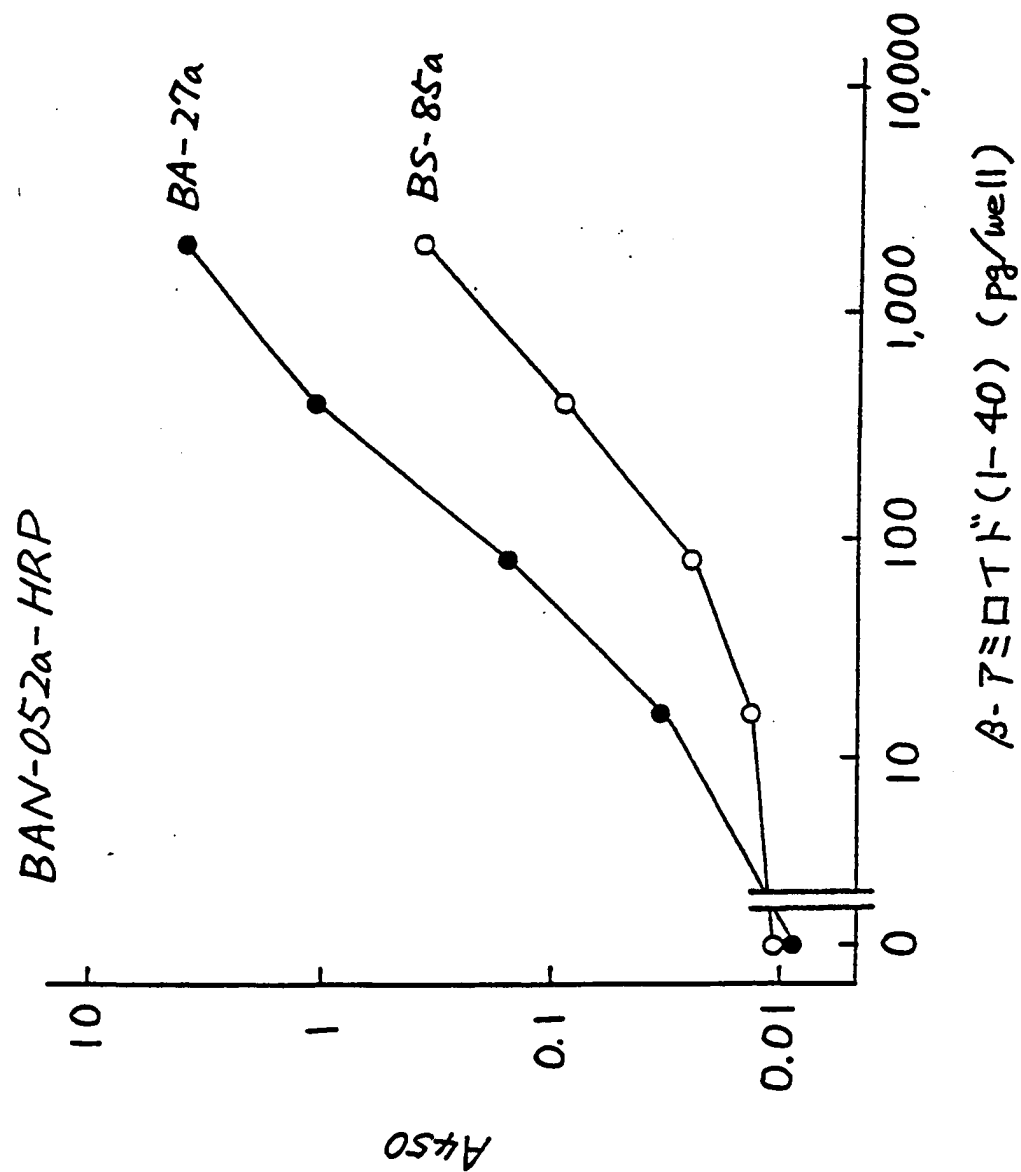
第9図



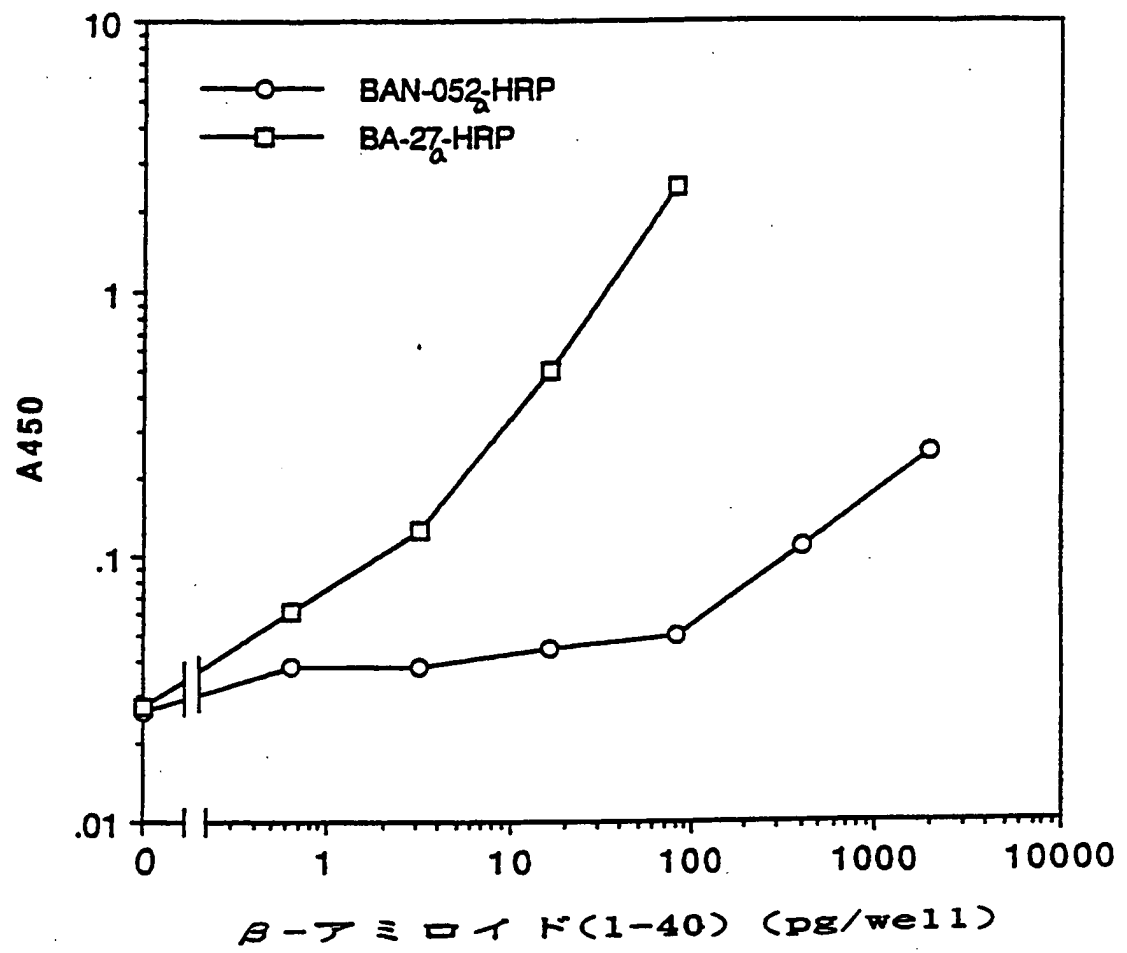
第10図



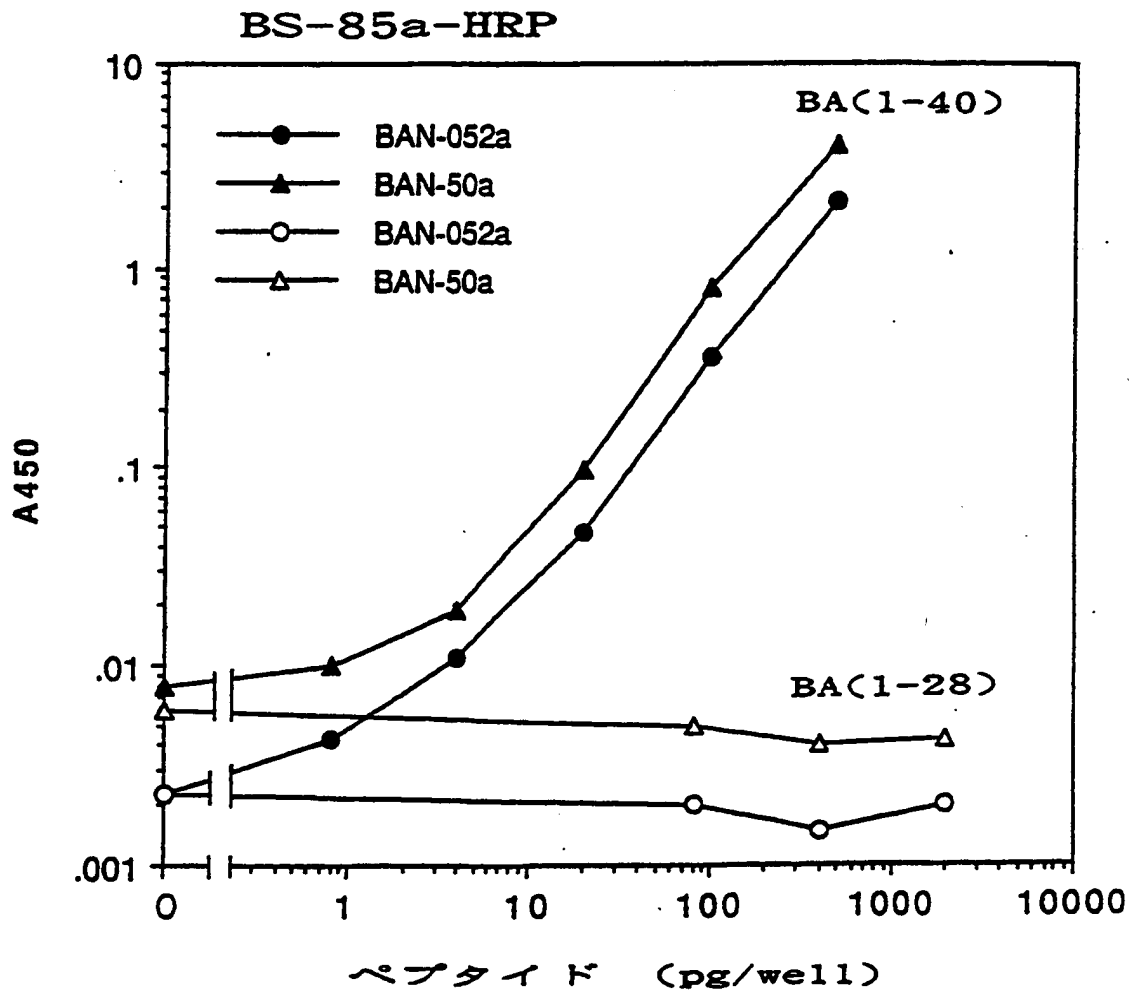
第111図



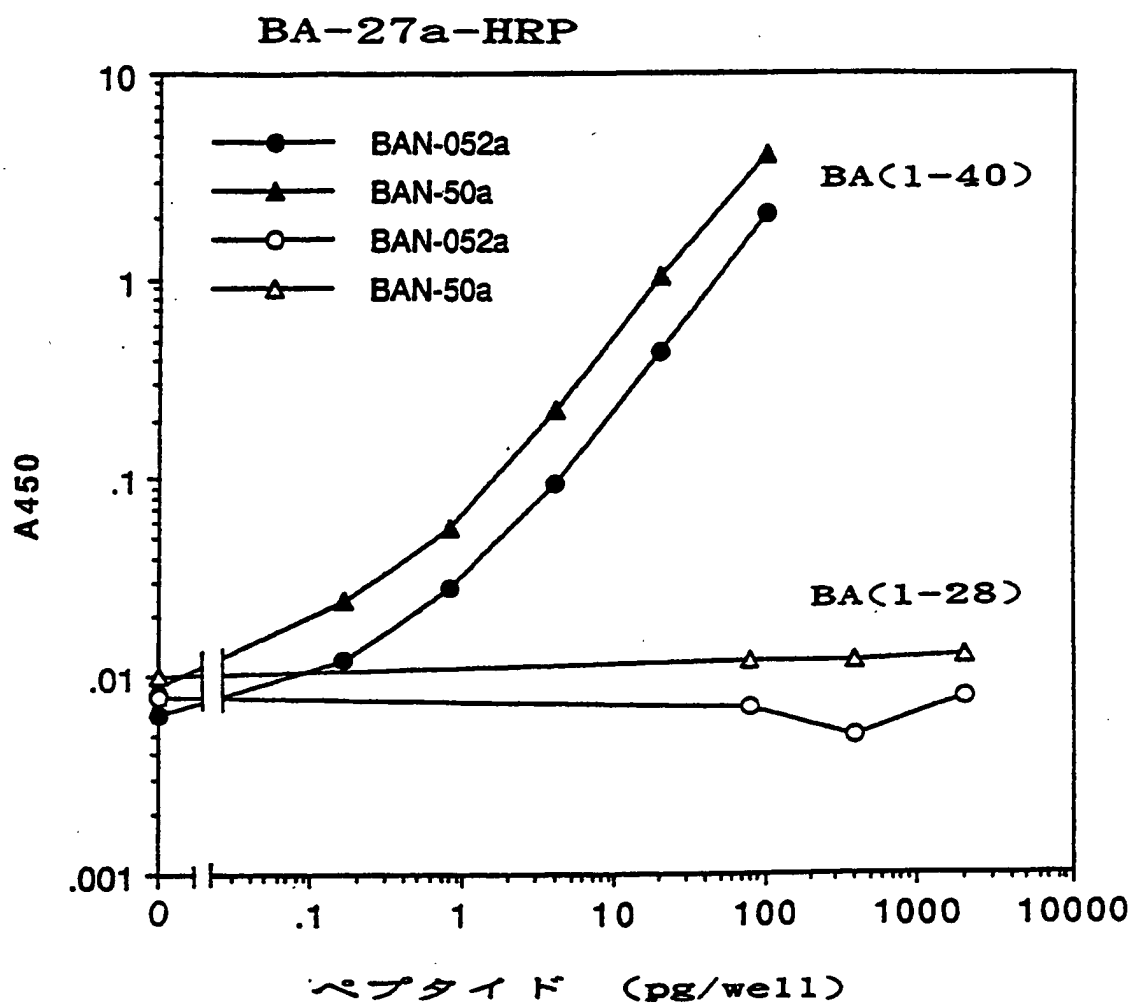
第 1 2 図



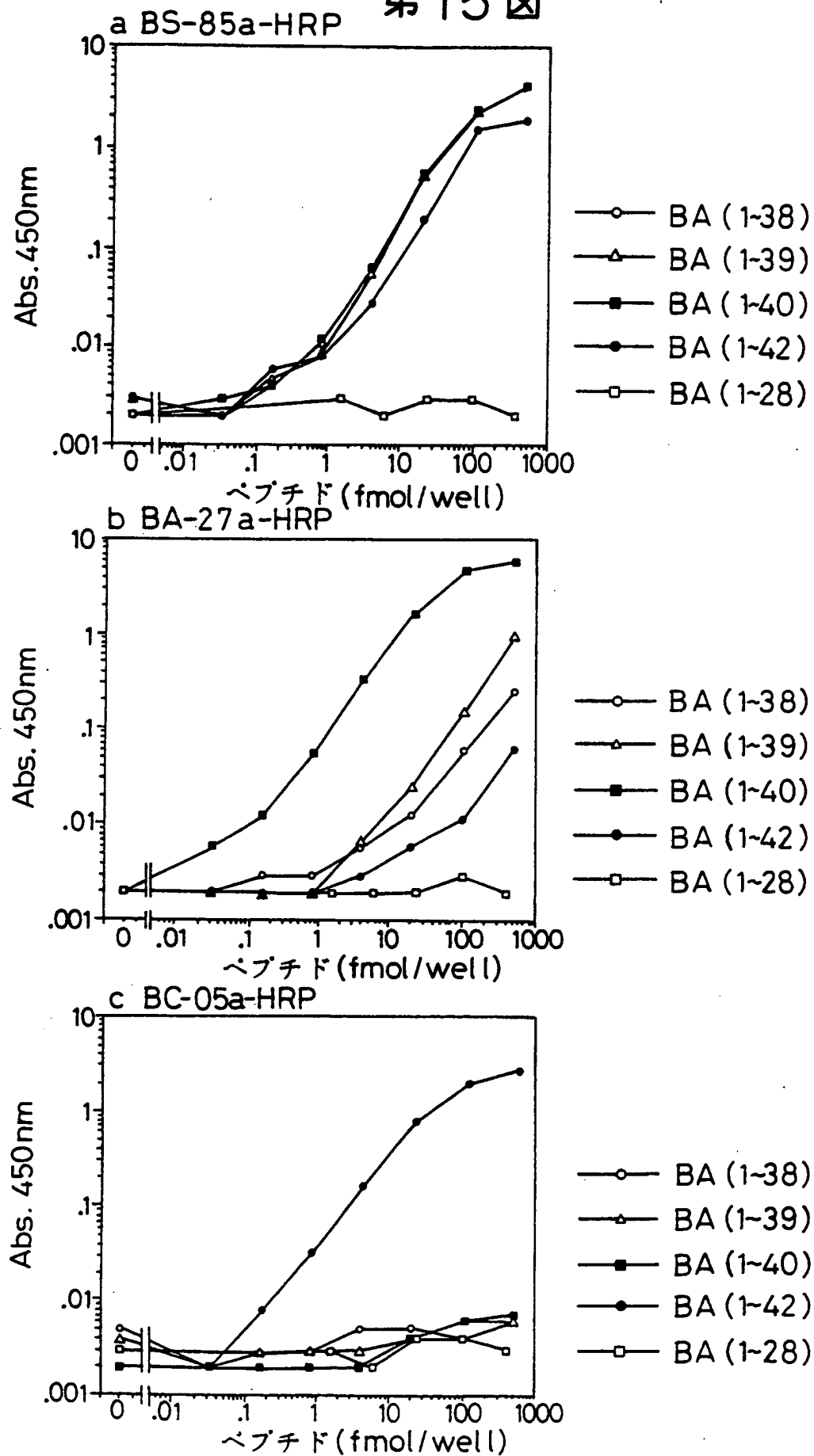
第 1 3 図



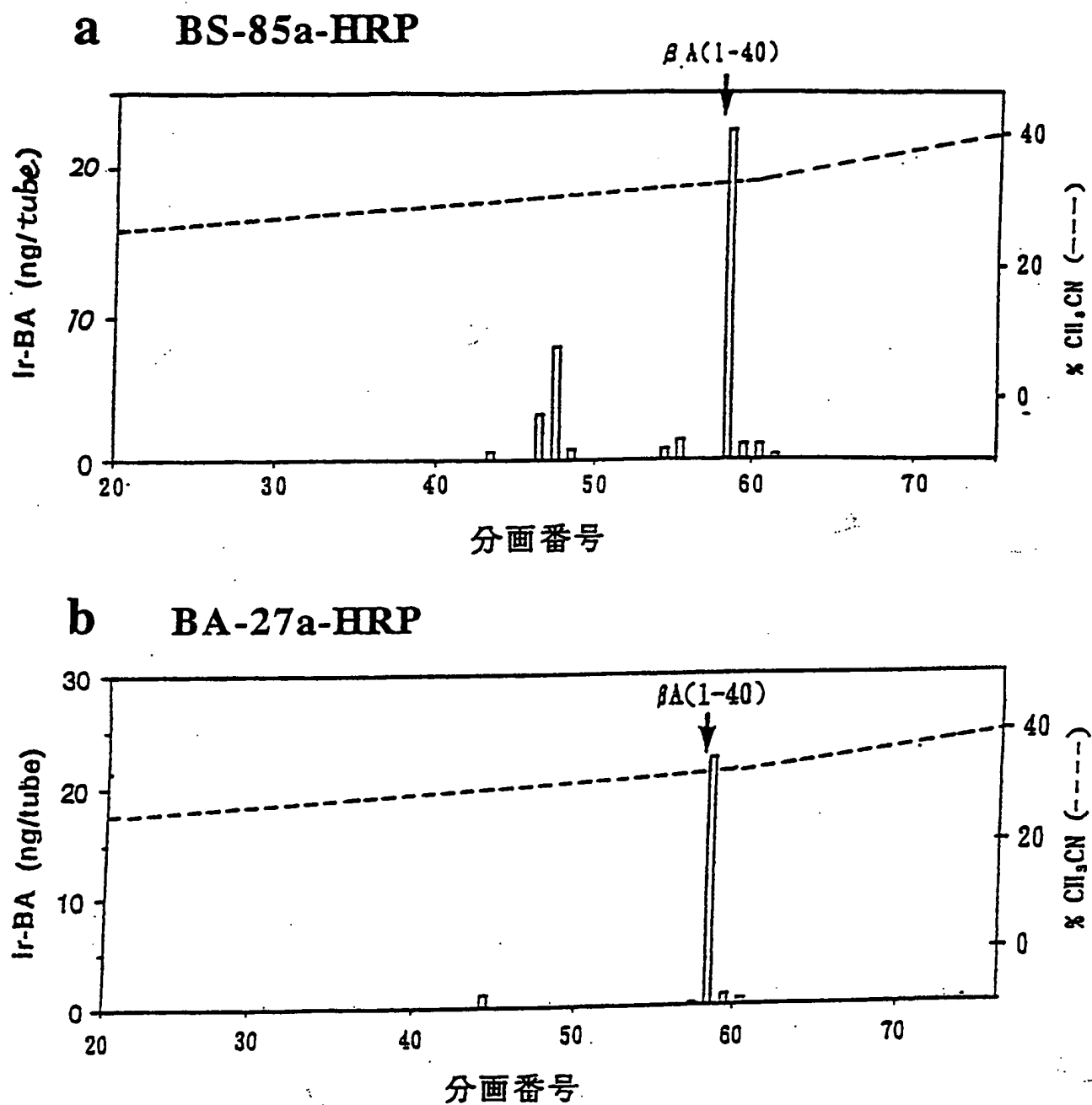
第 1 4 図



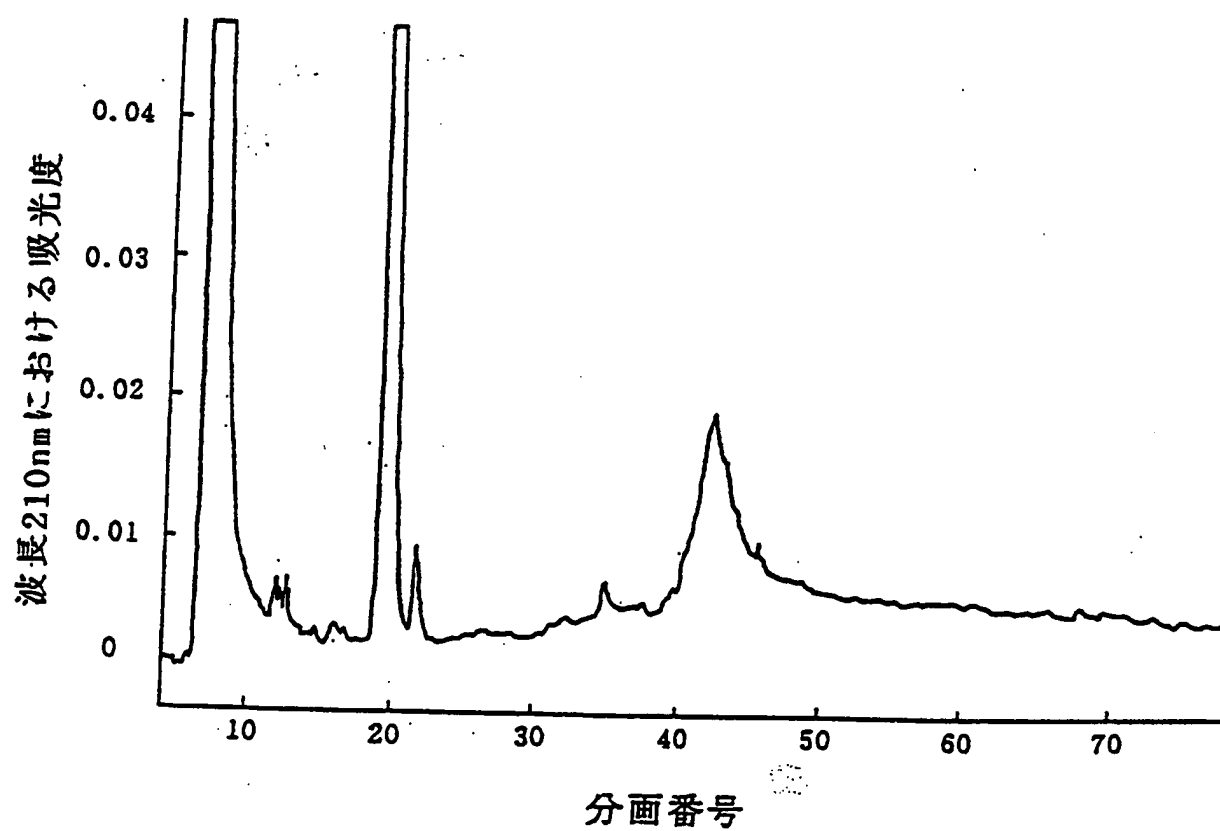
第 15 図



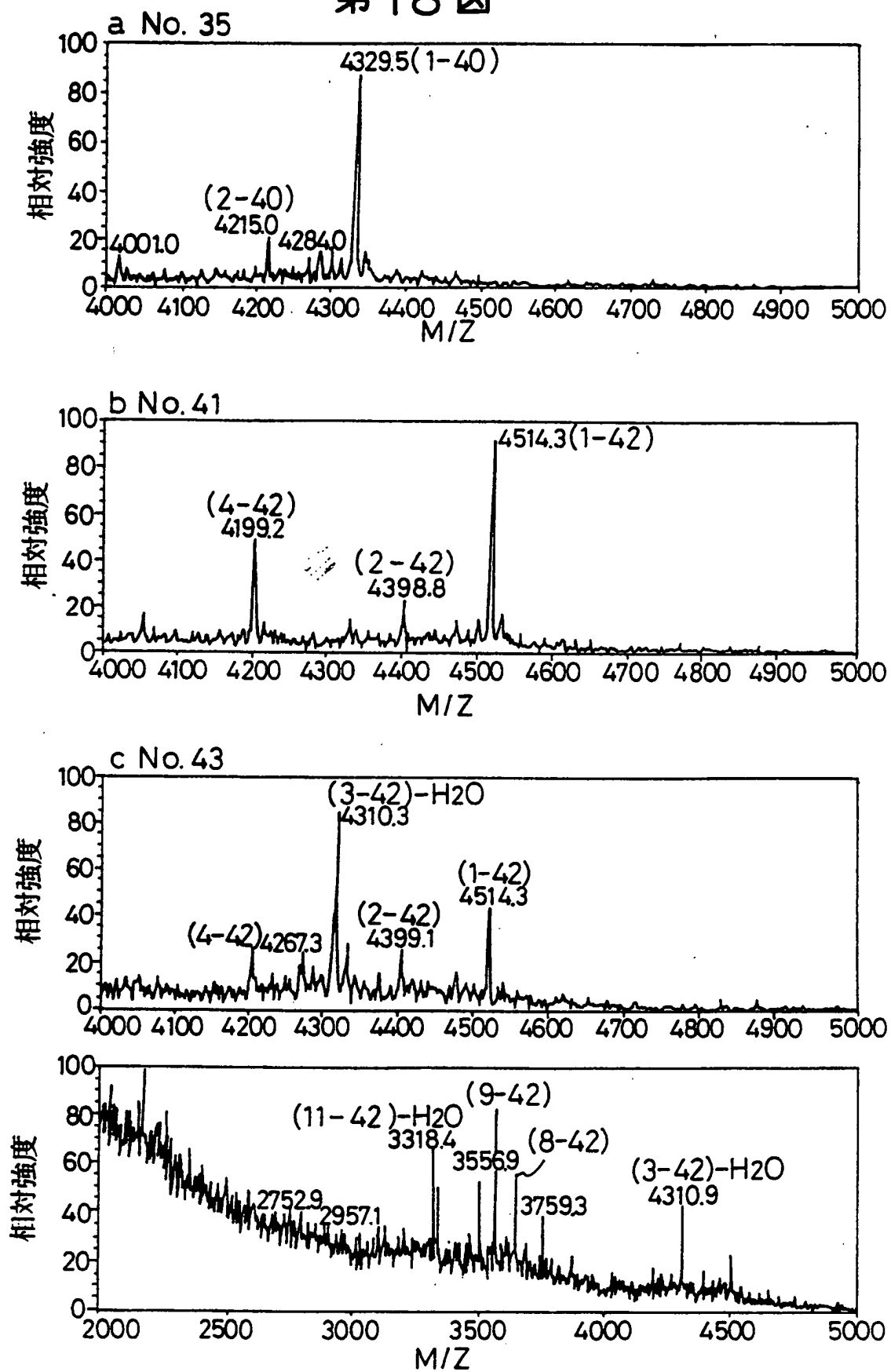
第 16 図



第 1 7 図

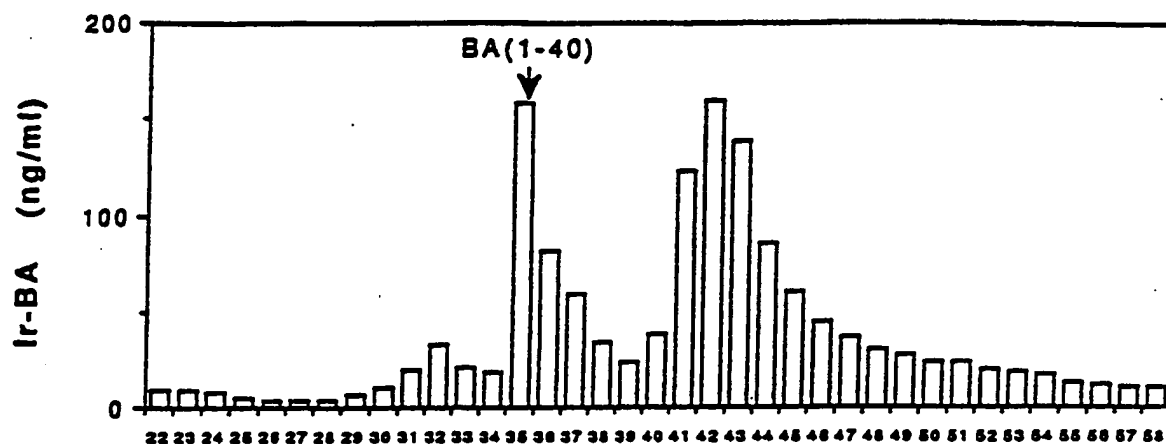


第 18 図

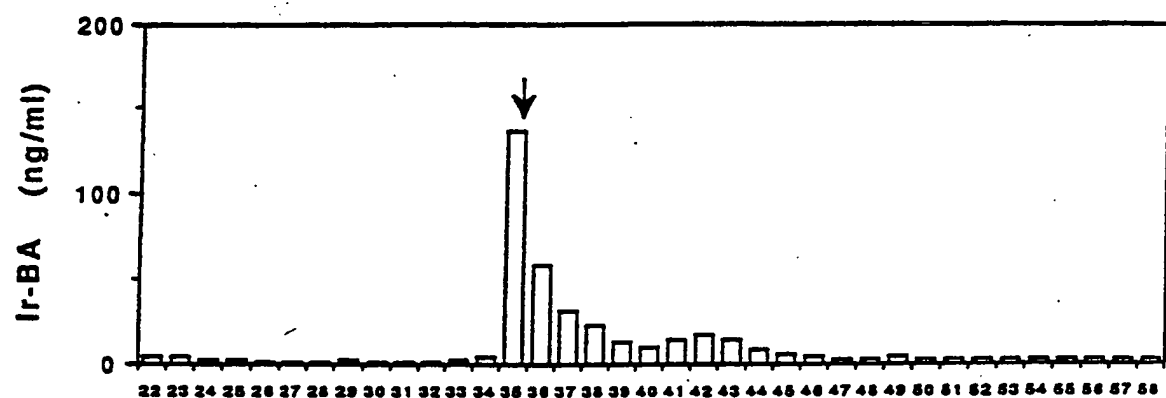


第 19 図

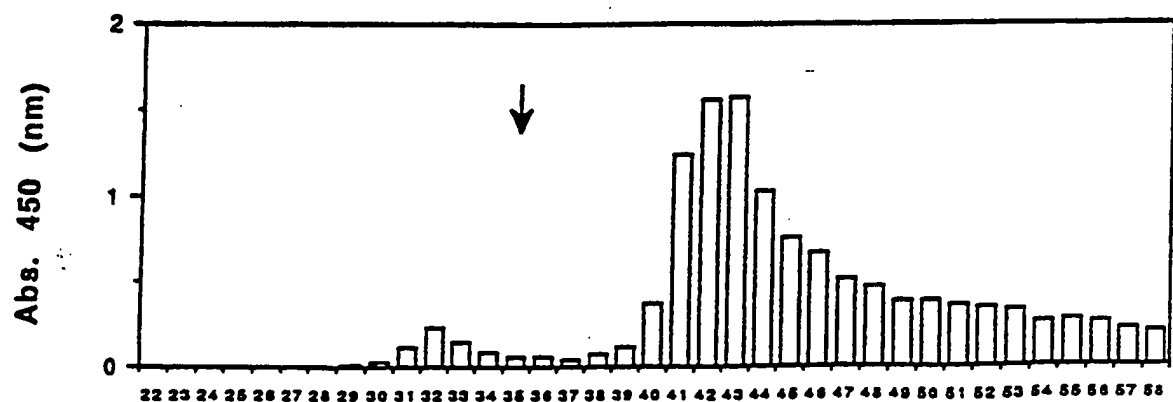
a BS-85a



b BA-27a



c BC-05a



分画番号

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12P21/08, 15/06, 5/20 // (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/02-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI

"andibody", "antiserum", "beta", "amyloid", "terminal", "C", "N"

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	Nature, Vol. 359, (1992), P. Seubert, et. al. "Isolation and quantification of soluble Alzheimers β -peptide from biological fluids", P. 325-327	$\frac{7-13}{16-17}$
$\frac{X}{Y}$	Journal of Neurochemistry, Vol. 59, No. 6, (1992), J. P. Anderson, et. al. "An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein Containing a potentially amyloidogenic sequence", P. 2328-2331	$\frac{11-13}{16-17}$
$\frac{X, P}{Y, P}$	Journal of Chemical Neuroanatomy, Vol. 6, No. 3, (1993), K. Imaizumi, et. al. "Coexistence of amyloid β -protein precursor and basic fibroblast growth factor in single cells of the rat parietal cortex, hippocampus and basal magnocellular nucleus", P. 159-165	$\frac{7-10}{16-17}$
X, P	Acta Neuropathologica, Vo. 85, No. 2, (1993), H. Takahashi, et. al. "Monoclonal antibody to	$\frac{7-10}{16-17}$

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 13, 1994 (13. 04. 94)

Date of mailing of the international search report

April 26, 1994 (26. 04. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00089

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	β -peptide recognizing amyloid deposits neuronal Cells and lipofuscin pigments in systemic organs", P. 159-166	16-17
A	Neurobiology of Aging, Vol. 12, No. 2, (1991), G. M. Cole, et. al. "Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques", P. 85-92	1

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- as per attached sheet -

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

First, claims 1 through 6 and 14 through 17 pertain to antibodies that react with a partial peptide on the C-terminal side of β -amyloid or a derivative thereof, an assay method using the antibodies, and hybridomas producing the antibodies. Second, claims 7 through 10 pertain to monoclonal antibodies that react with a partial peptide on the N-terminal side of β -amyloid or a derivative thereof and hybridomas producing the antibodies. Finally, claims 11 through 13 pertain to antibodies that react with a partial peptide on the central portion of β -amyloid or a derivative thereof and hybridomas producing the antibodies.

In addition, the antibodies (including monoclonal ones) that react with β -amyloid or a derivative thereof are well known, and hence these three groups of inventions cannot be deemed to relate to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P21/08.15/06.5/20
 // (C12P21/08.C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12P21/00.21/02.21/08.
 C12N15/02-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI
 "andibody", "antiserum", "beta", "amyloid", "terminal", "C", "N"

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Nature, 第359巻, (1992), P. Seubert et al "Isolation and quantification of soluble Alzheimers β -peptide from biological fluids", p. 325-327	7-13 16-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
 の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
 矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
 に引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
 性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
 献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
 がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.04.94

国際調査報告の発送日

26.04.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤 真由美

4 B 9 3 5 8

電話番号 03-3581-1101 内線

3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	Journal of Neurochemistry . 第59巻 . 第6号 . (1992), J. P. Anderson, et al "An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein Containing a potentially amyloidogenic sequence", p. 2328-2331	$\frac{11-13}{16-17}$
$\frac{X.P}{Y.P}$	Journal of Chemical Neuroanatomy, 第6巻 . 第3号 . (1993), K. Imaizumi . et al "Coexistence of amyloid β -protein precursor and basic fibroblast growth factor in single cells of the rat parietal cortex, hippocampus and basal magnocellular nucleus", p. 159-165	$\frac{7-10}{16-17}$
$\frac{X.P}{Y.P}$	Acta Neuropathologica . 第85巻 . 第2号 . (1993), H. Takahashi . et al "Monoclonal antibody to β -peptide recognizing amyloid deposits neuronal Cells and lipofuscin pigments in systemic organs". p. 159-166	$\frac{7-10}{16-17}$
A	Neurobiology of Aging . 第12巻 . 第2号, (1991), G. M. Cole . et al "Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques", p. 85-92	1

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6, 14-17は、 β -アミロイドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに反応する抗体及びその抗体を用いた定量法、及びその抗体を産生するハイブリドーマに関するものである。また、請求の範囲7-10は、 β -アミロイドまたはその誘導体のN端側の部分ペプチドに反応するモノクローナル抗体及びそれ

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

を産生するハイブリドーマに関するものである。さらに、請求の範囲11-13は、 β -アミロイドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに反応する抗体及びそれを産生するハイブリドーマに関するものである。

そして、 β -アミロイドまたはその誘導体に反応する抗体（モノクローナル抗体を含む）は公知であるから、これら3つの発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。